



Séroprévalence de *Borrelia burgdorferi* chez les chevaux en Wallonie: un indicateur de la maladie de Lyme ?

Mémoire présenté par **Carole MEERSSCHAERT**
en vue de l'obtention du grade de
Master en sciences de la Santé Publique
Finalité spécialisée épidémiologie et économie de la
santé
Année académique 2015-2016

Séroprévalence de *Borrelia burgdorferi* chez les chevaux en Wallonie: un indicateur de la maladie de Lyme ?

Mémoire présenté par **Carole MEERSSCHAERT**
en vue de l'obtention du grade de
Master en sciences de la Santé Publique
Finalité spécialisée épidémiologie et économie de la
santé

Année académique 2015-2016

Promotrice : Professeur Hélène Amory

Co-promoteur : Docteur Guy Hendrickx

Résumé

Contexte

La borréliose constitue l'infection transmise par les tiques la plus fréquente dans l'hémisphère Nord. Elle touche tant l'homme que plusieurs espèces animales dont les chevaux. Les interactions complexes entre l'agent pathogène, *Borrelia burgdorferi* spp, le vecteur, principalement *Ixodes ricinus* en Europe, et la grande variété d'hôtes potentiels ainsi que l'influence de facteurs climatiques et non climatiques sur ces interactions argumentent en faveur de la nécessité de mettre en place une collaboration interdisciplinaire pour la surveillance et la prévention. Du fait que les chevaux et les hommes partagent souvent le même habitat, les données épidémiologiques collectées chez les chevaux pourront s'avérer utiles pour évaluer les facteurs de risques de la maladie de Lyme chez l'homme. Le manque de cas cliniques documentés chez les chevaux ainsi que le manque de symptômes cliniques spécifiques font de cette maladie un véritable défi sur le plan diagnostique pour les vétérinaires. Les tests sérologiques sont pour cette raison des outils précieux.

Objectifs

L'objectif de notre étude était de fournir des données épidémiologiques fiables concernant la séroprévalence de *Borrelia burgdorferi* chez les chevaux vivant en Wallonie et d'évaluer la valeur diagnostique des tests sérologiques couramment utilisés (IF et ELISA) de façon à promouvoir une interprétation critique des résultats positifs. Un diagnostic erroné de borréliose va en effet avoir des conséquences néfastes tant pour le cheval que pour la santé publique en terme de la menace que cela représente pour le développement de l'antibiorésistance. En essayant de promouvoir l'utilisation appropriée des tests sérologiques nous souhaitons promouvoir l'utilisation raisonnée des antibiotiques.

Matériel et méthode

Nous avons réalisé une étude de séroprévalence sur un échantillon de 303 sérums prélevés entre avril 2014 et avril 2016 chez des chevaux vivant en Wallonie qui n'avaient pas présenté de signes cliniques suspects de maladie de Lyme au cours des 12 derniers mois. Dans un second temps nous avons évalué la valeur diagnostique des tests ELISA et IF en comparant les résultats de 100 sérums avec les résultats du test western blot, utilisé comme standard de référence. Dans la troisième partie nous avons évalué l'impact de 4 stratégies diagnostiques de prise en charge de chevaux suspects de borréliose et nous avons évalué les conséquences en termes de coût pour le propriétaire et en termes de consommation en antibiotiques en mettant l'accent sur la réduction d'antibiotiques non justifiés.

Conclusions

Une séroprévalence de 22% a été observée sur notre échantillon avec un effet significatif de l'âge du cheval sur la séroprévalence (p -valeur=0.02). Aucune association significative n'a pu être mise en évidence entre la prévalence d'anticorps *Borrelia burgdorferi* et la province où résidaient les chevaux, ni entre la séroprévalence et le mois ou l'année de prélèvement. Lors de l'évaluation de la valeur diagnostique des tests sérologiques nous avons pu observer que les tests ELISA et IF avaient tous les deux une bonne sensibilité et qu'ils sont de ce fait adaptés comme test de première ligne. Leur spécificité est par contre trop basse pour pouvoir se fier sur ces tests pour confirmer un diagnostic de maladie de Lyme. Un deuxième test plus spécifique (WB) est nécessaire pour confirmer les résultats positifs. Par rapport à l'utilisation raisonnée des antibiotiques on a pu observer une diminution possible de 47% d'antibiotiques non justifiés lorsqu'on choisit la stratégie des deux tests.

Mots-clés

Maladie de Lyme- séroprévalence- valeur diagnostique- utilisation raisonnée des antibiotiques

Abstract

Background

Lyme borreliosis is the most prevalent tick-borne infection in the northern hemisphere affecting both humans and animals including horses. The complex interactions between the pathogen, *Borrelia burgdorferi* spp, the vector, mainly *Ixodes ricinus* in Europe and the widespread range of hosts, as well as the impact of several climatic and non-climatic factors affecting these interactions support the necessity of interdisciplinary collaboration for surveillance and prevention. Because humans and horses commonly share the same habitat the epidemiological data collected in horses can be potentially useful for assessing risk factors for human borreliosis. Unfortunately, the lack of documented clinical cases and the lack of specific symptoms in horses make diagnosis a challenging task for veterinarians. Antibody testing is for these reasons a valuable tool.

Objectives

The objective of our study was to provide accurate data concerning the prevalence of *Borrelia burgdorferi* antibodies in horses living in the Southern part of Belgium as well as to assess diagnostic value of the commonly used serological tests (IF and ELISA) in order to promote critical interpretation of positive test results. An invalid diagnosis of Lyme disease will indeed have negative consequences for the horse as well as for public health regarding to the threat this represents for antibiotic resistance. By arguing adapted use of serologic testing we intended to promote rational use of antibiotics.

Material and method

We conducted a prevalence study on a sample of 303 serums collected between April 2014 and April 2016 from horses living in Wallonia who hadn't presented any clinical symptom suggestive of Lyme disease in the past 12 months. Secondly we assessed the diagnostic value of the two most commonly used serologic tests ELISA and IF, by comparing the test results of 100 serums with the results of a western blot test, used for the purpose as reference standard. In the third part we evaluated the impact of 4 different diagnostic strategies and evaluated the outcome in terms of cost for the owner and antibiotic consumption with emphasize on preventing unnecessary use of antibiotics.

Conclusions

A seroprevalence of 22% was observed in our sample with an evidence of age related effect (p-value=0.02). No significant effect of location neither year or month of sampling could be observed on the prevalence of *Borrelia burgdorferi* antibodies. When evaluating diagnostic value of serological tests we could observe that IF and ELISA tests both perform well regarding to sensitivity and are adapted tests when used as first step testing. Their specificity is too low to be able to be confident in these tests to confirm Lyme disease in horses. A second more specific test (western blot) is necessary to confirm the positive results. With regard to rational use of antibiotics we could observe a possible decrease of 47% of non-appropriate antibiotic use when choosing for a two-step strategy.

Keywords

Lyme disease-seroprevalence-diagnostic testing-rational antibiotic use

Remerciements

Je souhaiterais remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail et plus particulièrement :

Ma promotrice, le Professeur Hélène Amory, pour sa disponibilité, sa rigueur et son soutien tout au long de ce travail ;

Mon co-promoteur, le Docteur vétérinaire Guy Hendrickx ainsi que Valérie De Waele, pour leurs conseils et leur dynamisme ;

Les membres de mon comité d'accompagnement qui m'ont soutenue par la relecture et leurs conseils ;

Les responsables et les technologues du laboratoire départemental Frank Duncombe (CAEN) pour le soutien qu'ils ont apporté à cette recherche et pour leur accueil chaleureux ;

Les technologues du service de sérologie et Thomas qui a minutieusement alliqué les sérums ;

Les vétérinaires praticiens qui nous ont soutenues dans cette recherche ;

Les responsables des Laboratoires Réunis qui m'ont soutenue dans ce projet de collaboration avec la clinique équine de la Faculté vétérinaire de Liège ;

Je voudrais également remercier l'ensemble du département de santé publique de l'Université de Liège qui a « accueilli » une vétérinaire m'initiant à l'épidémiologie et concrétisant ainsi le concept « one health » ;

Et enfin, je tiens à remercier très sincèrement mes enfants et mes amis proches qui m'ont apporté leur soutien et qui ont tous, d'une façon ou d'une autre, contribué à la réalisation de ce mémoire.

Table des matières

Introduction	3
Cadrage théorique.....	5
1. Agent pathogène, hôtes et vecteur.....	5
2. Epidémiologie de la maladie de Lyme	8
3. Pathogénie et symptômes	10
4. Diagnostic et traitement.....	11
Séroprévalence de <i>Borrelia burgdorferi</i> chez les chevaux non suspects de Lyme en Wallonie.....	15
1. Introduction	15
2. Matériel et méthode.....	16
3. Résultats	20
4. Discussion	22
5. Limites et forces de l'étude	23
Etude comparative des tests sérologiques <i>Borrelia burgdorferi</i> ELISA et IF.....	25
1. Introduction	25
2. Matériel et méthode.....	28
3. Résultats	30
4. Discussion	34
5. Forces et limites de l'étude.....	36
Analyse coût/bénéfice de différentes stratégies diagnostiques de prise en charge d'un cheval suspect de maladie de Lyme	37
1. Introduction	37
2. Matériel et méthode.....	38
3. Résultats	40
4. Discussion	41
5. Limites et forces de l'étude	42
Conclusions	43
Bibliographie	45
Annexes.....	52
Annexe 1 : analyse rétrospective des résultats de sérologie <i>Borrelia burgdorferi</i> chez 1259 chevaux suspects de maladie de Lyme en Belgique	52
Annexe 2 : questionnaire utilisé pour l'étude de séroprévalence <i>Borrelia burgdorferi</i> chez les chevaux non suspects de borréliose résidant en Wallonie.....	54

Annexe 3: critères d'évaluation des bandes réactives du test WB <i>Borrelia burgdorferi</i> (OspA LINE)	55
Annexe 4: arbre décisionnel : évaluation de 4 stratégies de prise en charge de chevaux suspects de maladie de Lyme en Wallonie	56
Annexe 5 : considérations éthiques	57

Introduction

La maladie de Lyme est une zoonose majeure et elle constitue la maladie transmise à l'homme par les tiques la plus fréquente dans l'hémisphère Nord et en Europe (European Concerted Action on Lyme Borreliosis 2016, Pritt *et al.* 2016, van den Wijngaard *et al.* 2015). L'agent pathogène est un spirochète appartenant au complexe *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Il est maintenu dans un cycle naturel d'infection qui implique le vecteur, principalement *Ixodes ricinus* en Europe (Bleyenheuft *et al.* 2015, Richard et Oppliger, 2015), et de très nombreuses espèces hôtes qui peuvent être des mammifères, des oiseaux, ou des reptiles (Butler *et al.* 2005, Heylen *et al.* 2015). Parmi ces hôtes, certains jouent un rôle de réservoir, assurant ainsi la persistance de *Borrelia burgdorferi* dans les zones endémiques (Perez *et al.* 2012, Rizzoli *et al.* 2011). De par la complexité des interactions entre l'agent pathogène, le vecteur et les espèces hôtes ainsi qu'en raison de l'influence de nombreux facteurs biotiques et non biotiques dans la distribution du vecteur et des espèces hôtes (Linard *et al.* 2007, Medlock *et al.* 2013), l'approche des facteurs de risques de la maladie de Lyme dans l'optique « one health » est essentielle.

La maladie de Lyme est une maladie inflammatoire multisystémique causée par la réponse immune de l'organisme à l'agent pathogène (Rizzoli *et al.* 2011). Ses conséquences du point de vue médical et économique peuvent être lourdes. L'impact, en terme de morbidité ou de consommation de tests de laboratoires et/ou d'antibiotiques pas toujours justifiés, fait depuis quelques années l'objet de nombreuses études (Johnson 2011, Lohr *et al.* 2015, van den Wijngaard *et al.* 2015, Vourc'h *et al.* 2016). Cette pathologie fait également l'objet d'une attention croissante en santé publique ces dernières décennies en raison de l'augmentation de la prévalence décrite chez l'homme dans certains pays européens, alors que dans d'autres pays elle est considérée comme stable (Bleyenheuft *et al.* 2015 ; Obsomer *et al.* 2013). Dans ce contexte, il est primordial de rassembler un maximum d'informations épidémiologiques utiles à l'évaluation du risque d'exposition et à la mise en place de programmes de prévention (Braks *et al.* 2014). De nombreuses données épidémiologiques sont disponibles pour l'Europe et la Belgique. Ces informations permettent d'évaluer la répartition spatiale du risque d'exposition. Elles ont des implications importantes pour définir les priorités d'action en termes de santé publique (Braks *et al.* 2014, Linard *et al.* 2007, Medlock *et al.* 2013). Les données de séroprévalence chez les chiens et chez les chevaux et l'utilité de ces espèces comme espèces sentinelles a été proposée par plusieurs auteurs (Bryan *et al.* 2011, Claerebout *et al.* 2013, Goossens *et al.* 2001, Little *et al.* 2010, Wagner *et al.* 2012). Il n'existe, à notre connaissance, aucune étude réalisée pour évaluer la séroprévalence des anticorps *Borrelia burgdorferi* chez les chevaux résidant en Wallonie. Par contre, elle a été étudiée en 2006 chez les chevaux vivant dans le Nord de la Belgique par Moyaert *et al.* Le premier objectif de cette étude est d'étudier la séroprévalence de la borréliose chez les équidés vivant dans le Sud du pays.

De par la complexité et la diversité des symptômes, le diagnostic de la maladie de Lyme est sujet à de nombreuses controverses tant en médecine humaine (Aguero-Rosenfeld et Wormser 2015, Perronne 2014) qu'en médecine vétérinaire (Greene et al. 2012), et particulièrement en médecine équine où de nombreux chevaux sont séropositifs mais ne présentent que rarement des signes cliniques (Reed et Toribio 2004). Une approche largement répandue sur le terrain mais peu justifiable scientifiquement consiste, vu l'absence de signes cliniques spécifiques, à réaliser un test sérologique de première ligne, de type ELISA ou immunofluorescence (IF), chez les chevaux suspects de borréliose et de mettre en place une antibiothérapie de longue durée suite aux résultats d'un test sérologique positif pour lesquels aucun test de confirmation n'a été réalisé. L'objectif de la deuxième partie de ce travail est d'évaluer les paramètres de validité diagnostique des tests ELISA et IF par rapport au western blot (WB), qui sera utilisé comme standard de référence dans l'étude comparative. Les tests sérologiques constituent en effet une précieuse aide au diagnostic mais il est essentiel d'interpréter les résultats de façon critique pour éviter d'instaurer des traitements antibiotiques non justifiés.

L'impact joué par l'utilisation d'antibiotiques en médecine vétérinaire sur le développement de l'antibiorésistance et ses conséquences en santé publique est régulièrement pointé du doigt (Chantziaras et al. 2014, Grave et al. 2012, Mc Ewen 2012, Office International des Epizooties 2016, von Wintersdorff et al. 2016). Il est donc légitime de se poser la question de la pertinence du traitement antibiotique administré aux chevaux suspects de borréliose en l'absence de test de confirmation. La troisième partie de ce travail a pour objectif de promouvoir l'utilisation raisonnée des antibiotiques chez les chevaux suspects de maladie de Lyme en apportant à travers une analyse coût/bénéfice une aide à mettre en place pour assurer la meilleure stratégie face à un cheval suspect de maladie de Lyme.

Les résultats de ce mémoire sont dès lors présentés sous forme d'un ensemble cohérent de trois études :

Dans la première partie du travail, la séroprévalence des anticorps *Borrelia burgdorferi* chez des chevaux n'ayant pas présenté de signes cliniques de borréliose et vivant en Wallonie a été évaluée.

Dans la deuxième partie de ce travail, les paramètres de performance diagnostique (sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et négative) des deux tests sérologiques de première ligne les plus couramment utilisés en Belgique pour le diagnostic de la maladie de Lyme chez les chevaux (ELISA et IF) ont été évalués en utilisant le WB comme standard de référence.

Dans la troisième partie ont été analysées à l'aide d'un arbre décisionnel les conséquences de différentes stratégies diagnostiques possibles face à des chevaux suspects de maladie de Lyme, afin d'essayer de dégager la meilleure stratégie d'un point de vue coût/bénéfice.

Cadrage théorique

1. Agent pathogène, hôtes et vecteur

L'agent pathogène responsable de la maladie de Lyme est un spirochète appartenant au complexe *Borrelia burgdorferi sensu lato* qui ne comprend pas moins de 18 génotypes différents (Rizzoli *et al.* 2011). *Borrelia afzeli* et *Borrelia garinii* sont les principales espèces pathogènes chez l'homme en Europe, mais d'autres espèces comme *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, qui est la principale souche responsable de la maladie de Lyme en Amérique du Nord, sont également présentes en Europe (European Centre for Disease Prevention and Control 2016). Au moins 9 espèces sont décrites comme étant potentiellement pathogènes pour l'homme et pour différentes espèces domestiques dont les chevaux, les chiens, les bovins, ou encore les chats même si ces derniers semblent plus résistants à l'infection (Greene *et al.* 2012, Lapin *et al.* 2015, Pritt *et al.* 2016). Les espèces qui sont pathogènes tant pour l'homme que pour le cheval sont *Borrelia afzeli*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto* et *Borrelia lusitaniae* (Passamonti *et al.* 2015, Reed et Toribio 2004, Veronesi *et al.* 2012). Le terme de maladie de Lyme est utilisé depuis la publication en 1982 par Burgdorfer *et al.* d'un cas documenté chez un adolescent dans la ville de Old Lyme (Connecticut), confirmé par l'isolement de l'agent pathogène. La maladie était cependant décrite en Europe depuis les années 1880 sous différents noms dont l'érythème migrans (ECDC 2016).

La persistance de *Borrelia burgdorferi* dans les zones endémiques est assurée par des hôtes réservoirs, définis comme les espèces capables de transmettre l'agent pathogène à un vecteur compétent (Butler *et al.* 2005). En Europe, les espèces décrites comme étant des hôtes réservoirs compétents sont principalement les petits rongeurs (les souris, les musaraignes, les hérissons, les écureuils, les lapins) ainsi que certains reptiles (ex. les lézards) et différentes espèces d'oiseaux telles les passereaux (Gassner *et al.* 2013, Heylen *et al.* 2015, Pérez *et al.* 2012, Rizzoli *et al.* 2011). Ces derniers n'interviennent pas seulement comme réservoir de l'agent pathogène. En effet, des études ont démontré que le comportement et la réaction physiologique des oiseaux pouvait favoriser la transmission, d'une part par la dispersion géographique du vecteur et de l'agent pathogène, et d'autre part, par des mécanismes de compensation observés chez les oiseaux infectés qui influencent positivement la survie de ces derniers et la transmission aux tiques non infectées (Heylen *et al.* 2015). Selon plusieurs auteurs, certains grands mammifères tels que les cervidés pourraient aussi jouer un rôle en tant qu'hôtes réservoirs (Pichon *et al.* 1999, Gassner *et al.* 2013, Vourc'h *et al.* 2016) mais ce rôle est controversé. Rosef *et al.* (2009) ont mis en évidence une diminution du taux d'infection des tiques par *Borrelia burgdorferi* dans les régions où la densité en cervidés était la plus grande et ils expliquent ce phénomène par le rôle de porteurs incompetents joué par les cervidés (Rosef *et al.*

Le principal vecteur de la borréliose en Europe est *Ixodes ricinus*. *Ixodes ricinus* est aussi la tique la plus répandue en Europe de l'Ouest (Claerebout *et al.* 2013). Le cycle de la tique dure en moyenne deux ans et est divisé en trois stades : le stade larvaire, le stade nymphal et le stade adulte. Les tiques se nourrissent une fois lors de chaque stade. Les larves éclosent des œufs déposés sur le sol et s'attachent à de petits mammifères et des oiseaux sur lesquels ils vont prendre leur premier repas et éventuellement s'infecter (Richard et Oppliger 2015). Au 2^{ième} stade, le stade nymphal qui se produit

[illegible]

6

son second repas que la tique, préalablement infectée lors de son premier repas, peut infecter l'homme ou d'autres grands mammifères. L'homme s'infecte principalement durant les mois de mai et de juillet à l'occasion d'un contact avec le vecteur (Ozdenerol 2015).

Ceci étant dit, la tique peut s'infecter à n'importe quel moment de son cycle lors d'un repas sanguin sur un hôte réservoir infecté ou par un mécanisme de « co-feeding ». Ce mécanisme assure le transfert de l'agent pathogène d'une tique à l'autre lorsque celles-ci se nourrissent à proximité l'une de l'autre sur un hôte même si ce dernier n'a pas été infecté (Rizzoli *et al.* 2011, Voordouw 2015).

La tique, une fois infectée, va à son tour transmettre la maladie aux hôtes sur lesquels elle se nourrit. Des délais d'infection variables ont été décrits en fonction des caractéristiques de l'agent pathogène : *Borrelia afzeli* peut être transmis durant les 24 premières heures alors que *Borrelia burgdorferi* nécessite 48 heures de fixation de la tique avant que la transmission ne commence (Rizzoli *et al.* 2011). Des mécanismes de transmission précoce ont cependant été proposés (Cook 2015), ce qui signifierait qu'un risque d'infection peut également exister beaucoup plus tôt que les délais

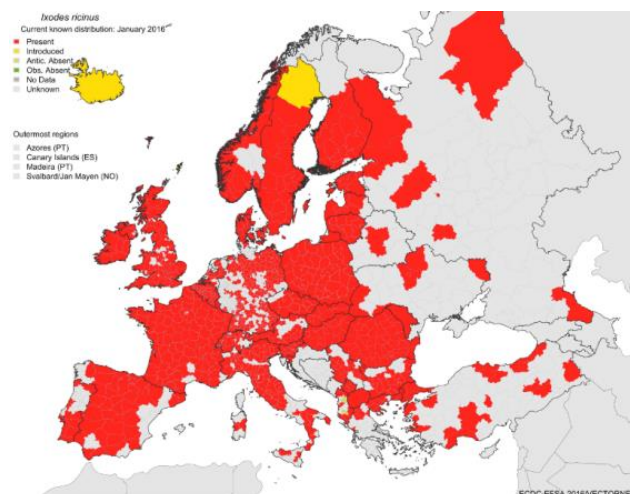
habituellement avancés.

Ixodes ricinus a une distribution très large qui s'étend du Portugal à la Russie et de la Scandinavie aux pays situés à l'extrême sud de l'Europe ainsi qu'aux pays le plus au nord du continent Africain.

La population d'*Ixodes ricinus* s'est étendue au cours de ces dernières années avec comme conséquence l'émergence des maladies vectorielles qu'elle transporte (Braks *et al.* 2014). Sa distribution géographique a changé tant au niveau de sa latitude et de son altitude qu'au niveau de sa densité (Medlock *et al.*

Figure 2 : répartition géographique d'*Ixodes ricinus* (source ECDC 2016)

2013). Les changements climatiques semblent jouer un rôle important dans cette redistribution, essentiellement le taux d'humidité et les changements de température (Medlock *et al.* 2013, Ozdenerol 2015). Ce sont en effet des facteurs importants pour la biologie et la dispersion des tiques. Cependant en Europe, l'influence des facteurs non climatiques tels que la relation entre les tiques et leurs hôtes ou l'aménagement et la gestion du territoire semble jouer un rôle prépondérant dans ce phénomène (Medlock *et al.* 2013). Les facteurs qui peuvent influencer directement ou indirectement la population des tiques reçoivent une attention croissante en santé publique dans la mesure où ils vont influencer le risque des maladies transmises par ceux-ci chez l'homme (Medlock *et al.* 2013, Ozdenorol 2015, Obsomer *et al.* 2013). Une meilleure compréhension et surveillance de l'évolution de la population



d'*Ixodes ricinus*, possible grâce à des outils d'information spatiale (GIS : Geographic Information System) et des outils de modélisation spatiale devrait permettre à l'avenir d'obtenir des données essentielles dans le cadre de l'évolution, mais aussi de la prévention de la maladie de Lyme (Medlock *et al.* 2013). La standardisation de la récolte et du traitement des données est cependant un challenge à relever pour pouvoir lutter efficacement contre les maladies vectorielles (Ozdenerol 2015, Braks *et al.* 2014).

2. Epidémiologie de la maladie de Lyme

La borréliose est reconnue comme étant la maladie vectorielle la plus commune dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord (Rizzoli *et al.* 2011, Medlock *et al.* 2013). La distribution de la maladie de Lyme en Europe est étroitement associée à la répartition géographique de son vecteur principal, *Ixodes ricinus*, ainsi qu'à son biotope (régions boisées, végétation dense) et la relation de ce dernier avec ses hôtes. Rizzoli *et al.* (2011) décrivent une diminution du potentiel de transmission de *Borrelia* par les tiques dans les zones où les hôtes réservoirs non compétents sont abondants par un effet de dilution (diminution de la prévalence d'infection des tiques par l'agent pathogène). Dans une publication récente Vourc'h *et al.* (2016) décrivent cependant une augmentation de la densité de tiques infectées dans les zones où le nombre de cervidés était le plus concentré. Linard *et al.* (2007) avaient également mis en évidence que la densité des cervidés en Belgique avait un impact sur la variation spatiale du risque de maladie de Lyme. Dans ce cadre il est intéressant de noter que la population de ruminants sauvages a doublé dans le Sud de la Belgique depuis 1975 (Lempereur, 2012) et constitue donc une composante qu'il faut analyser et dont il faut tenir compte pour lutter efficacement contre la maladie de Lyme. De par la complexité des interactions entre l'agent pathogène, le vecteur, et les espèces hôtes, ainsi qu'en raison de l'influence de nombreux facteurs biotiques et non biotiques dans la distribution de la maladie et du vecteur (Linard *et al.* 2007, Medlock *et al.* 2013), l'approche de la problématique et des facteurs de risques de la maladie de Lyme dans l'optique « one health » est essentielle. L'aménagement et la gestion du territoire ainsi que les habitudes de fréquentation des milieux dits « à risques » sont autant de facteurs à surveiller et sur lesquels il faudra intervenir lors de la mise en place de programmes de prévention (Braks *et al.* 2014, Richard et Oppliger 2015). Une grande partie de la variation spatiale du risque de maladie de Lyme peut en effet être expliquée par des facteurs environnementaux et socio-économiques (Braks *et al.* 2014).

Des données épidémiologiques sont depuis de nombreuses années récoltées en Europe et en Belgique comme par exemple des données sur le portage de *Borrelia burgdorferi* par les tiques (Claerebout *et al.* 2013), des relevés de déclaration de morsures par tique (TiquesNet.be) ou encore les cas rapportés de maladie de Lyme chez l'homme (Bleyenheuft *et al.* 2015, Linard *et al.* 2007, Medlock *et al.* 2013).

La prévalence moyenne d'infection des tiques par *Borrelia burgdorferi* en Europe est estimée à 12 %. (ECDC 2016). C'est en Europe centrale que les taux d'infection des tiques sont les plus élevés, et tout

particulièrement en Autriche, en Suisse, en Allemagne, en Slovénie, Slovaquie et République Tchèque où des prévalences de 20 % ont été observées (Rizzoli *et al.* 2011). En Belgique, la prévalence moyenne d'infection des tiques par la borréliose correspond à la moyenne européenne de 12 % (Kesteman *et al.* 2010). Claerebout *et al.* (2013) ont observé un taux fort similaire dans une étude réalisée en collaboration avec des vétérinaires où 2 373 tiques ont été collectées sur des chiens et des chats, identifiées et analysées pour la présence de différents pathogènes (*Borrelia spp.* 10.1 %)

Les chercheurs de l'Institut de Santé Publique belge (ISP) collectent également depuis juin 2015 via le site TiquesNet.be des informations sur le nombre de personnes mordues par tiques, ainsi que sur la localisation géographique de ces morsures dans le but de déterminer les zones les plus à risque (TiquesNet 2016). Les chiffres du nombre de consultations pour morsure de tique avancés pour la Belgique, basés sur une comparaison des périodes 2008-2009 versus 2003-2004, ne plaident pas en faveur d'une augmentation du nombre de morsures par tiques (Overlegorganen gezondheid België 2015) alors qu'aux Pays Bas, une augmentation constante du nombre de morsures par tiques entre 1994 et 2009 avait été rapportée par Hofhuis *et al.* (2015).

L'évolution du nombre de cas d'érythème migrant rapportés en consultation et du nombre de tests sérologiques positifs en médecine humaine, est un autre élément qui fait partie de la surveillance. La relative stabilité du nombre de cas de maladies de Lyme rapportés chez l'homme en Belgique au cours de ces dernières années (Overlegorganen gezondheid België 2015) est sujette à controverse car elle contraste avec l'augmentation du nombre de cas observés dans d'autres pays européens dont les Pays-Bas (Hofhuis *et al.* 2015, Obsomer *et al.* 2013).

Les chiffres sont collectés grâce à la collaboration des médecins généralistes et des laboratoires vigies. Aucune tendance d'augmentation importante n'a été mise en évidence en Belgique au cours des dix dernières années par ces réseaux, que ce soit dans le nombre de cas de maladies de Lyme rapportés durant la période 2003-2012 (Bleyenheuft *et al.* 2015) ou en ce qui concerne le nombre de résultats positifs. Le nombre de résultats positifs/nombre de tests réalisés reste stable (2 à 3 % pour les années 2007-2013) (ISP 2015).

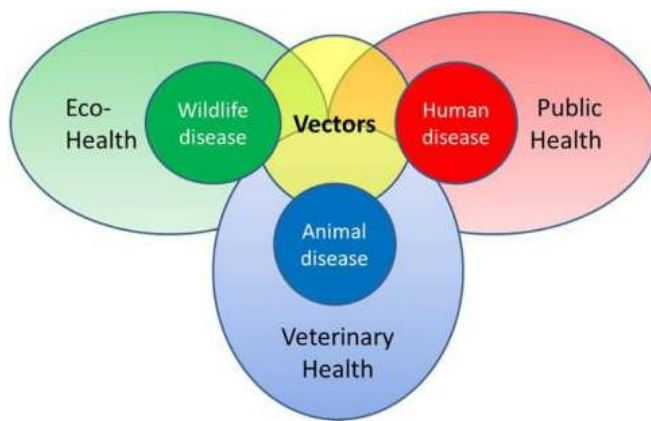


Figure 3 : Représentation des différentes disciplines impliquées
(source : Braks *et al.* 2014)

La mise en place de programmes de surveillance et de prévention des maladies vectorielles n'en reste pas moins une priorité pour les autorités de santé publique (Overlegorganen gezondheid Belgie 2015) et est un challenge en raison de la complexité des différents facteurs qui interviennent. Braks *et al.* (2014) proposent des pyramides de surveillance adaptées aux différentes maladies vectorielles qui tiennent

compte des différents facteurs climatiques et non climatiques et qui permettraient la mise en place de programmes de prévention holistiques. Afin de pouvoir tenir compte de la complexité des facteurs influençant ces maladies, les auteurs proposent une collaboration interdisciplinaire représentée dans le schéma reproduit en figure 3.

3. Pathogénie et symptômes

«La maladie de Lyme serait considérée comme une maladie auto-immune classique, si un agent pathogène n'avait pas été identifié» écrivent Borchers *et al.* en 2015 dans le *Journal of autoimmunity*, insistant sur les symptômes peu spécifiques et la difficulté de réaliser un diagnostic de certitude. En effet, la pathogénie à médiation immune (Rizzoli *et al.* 2011) et le fait que la maladie de Lyme puisse mimer des maladies inflammatoires rendent souvent le diagnostic clinique difficile, surtout dans les formes chroniques (Perronne 2014). Dans une étude génétique, Bouquet *et al.* (2016) se sont penchés sur l'évolution au cours du temps de l'expression génomique chez les patients atteints de maladie de Lyme dans le but de mieux comprendre les mécanismes de développement des symptômes persistant chez l'homme. Ils ont ainsi pu mettre en évidence qu'une fois la période très courte (3 semaines) d'infection aiguë terminée, la réponse immunitaire des patients et plus particulièrement l'expression génomique chez ceux-ci était comparable à celle observée chez les malades atteints d'autres pathologies à médiation immune.

Certaines formes classiques de la maladie de Lyme chez l'homme, comme par exemple l'érythème migrant observé dans 60 à 80 % des cas quelques jours ou quelques semaines après une morsure par tique, pose en général peu de problèmes en ce qui concerne le diagnostic (Rizzoli *et al.* 2011). Il n'en va pas de même chez le cheval chez qui les symptômes cliniques de la maladie de Lyme sont peu fréquents et, lorsqu'ils sont présents, ils sont souvent vagues et non spécifiques rendant le diagnostic de certitude de la maladie de Lyme très difficile et exceptionnel (Amory *et al.* 2014). Les symptômes chez les chevaux incluent de la fièvre, de la léthargie, des distensions articulaires, des boiteries inexplicables, des symptômes d'encéphalite, d'uvéite, des avortements ou des mortalités néonatales

(Reed et Toribio 2004, Butler *et al.* 2005). Le nombre de cas équine décrits dans la littérature est cependant très limité et parmi ceux-ci, très peu apportent des preuves indiscutables d'un diagnostic de maladie de Lyme (Divers *et al.* 2012). Le nombre de cas confirmés par une identification formelle de *Borrelia* se limite en fait à quelques cas d'uvéite (Priest *et al.* 2012), de polysynovite (Passamonti *et al.* 2015), de neuroborreliose (James *et al.* 2010, Imai *et al.* 2011) d'encéphalite (Burgess *et al.* 1987) et de pseudolymphome cutané (Sears *et al.* 2012). Pour d'autres cas rapportés, le diagnostic clinique était uniquement argumenté par des tests sérologiques positifs et il n'est pas exclu que des cas décrits de borreliose chez le cheval soient en réalité des maladies causées par d'autres pathogènes, voire des coinfection avec d'autres pathogènes transmis par les tiques comme l'anaplasmose (Butler *et al.* 2005). Plusieurs études ont mis ce phénomène de coinfection en évidence que ce soit chez les tiques chez qui la présence de plusieurs pathogènes par tique a pu être observée (Lempereur 2012) ou chez les chevaux chez qui des anticorps spécifiques dirigés contre différents pathogènes peuvent être présents. Dans une étude réalisée au Danemark, Hansen *et al.* (2010) ont observé 11 % de chevaux coinfectés par *Anaplasma phagocytophilum* et *Borrelia burgdorferi*.

4. Diagnostic et traitement

De nombreuses controverses existent quant au diagnostic de la maladie de Lyme, et ceci tant chez l'homme qu'en médecine vétérinaire (Aguero-Rosenfeld et Wormser 2015, Perronne 2014). L'absence de « gold standard » rend le diagnostic de certitude et l'interprétation des études épidémiologiques difficile (Perronne 2014 ; Wagner *et al.* 2011). En l'absence de signes cliniques spécifiques, le recours aux examens complémentaires, et plus particulièrement aux tests sérologiques s'est généralisé (Johnson 2011).

Une multitude d'examen complémentaires sont disponibles que ce soit pour la mise en évidence des anticorps ou de l'agent pathogène. Leur fiabilité et leur validité analytique et diagnostique est cependant variable (Marques *et al.* 2015). Certains tests, pourtant présents sur le marché, sont ainsi repris par le CDC (2016) sur la liste des tests ou procédures « non recommandées ». Parmi les procédures non recommandées figure par exemple le fait de réaliser un test de type western blot, sans avoir au préalable réalisé de test de première ligne de type IF ou ELISA.

Un autre problème largement décrit dans la littérature est la réalisation de tests inutiles. Beaucoup de tests demandés seraient en effet inappropriés non en raison de leur validité analytique insuffisante mais en raison de leur utilisation non adéquate (Aguero-Rosenfeld et Wormser 2015, Guellec *et al.* 2015). Johnson (2011) insiste sur l'importance de ne réaliser des tests sérologiques que chez des

patients ayant une probabilité prétest suffisamment élevée car dans le cas contraire, la valeur prédictive des tests de laboratoire n'est pas suffisante.

Les erreurs d'interprétation sont un autre problème soulevé dans ces publications et un bon nombre de résultats faux négatifs ou faux positifs seraient ainsi chaque année générés, non par la qualité insuffisante du test utilisé, mais du fait qu'il n'est pas tenu compte de la cinétique de la réponse immunitaire au moment de la réalisation ou de l'interprétation du test (Borchers *et al.* 2015).

Chez les chevaux, ce sont principalement des tests sérologiques de type IF et ELISA qui sont proposés en routine. Il est cependant important de rappeler que si ces tests mettent en évidence la présence d'anticorps *Borrelia burgdorferi*, ils ne sont, à eux seuls, pas suffisants pour orienter vers un diagnostic de maladie de Lyme (Butler *et al.* 2005). En effet, une séroprévalence, variable d'une région à l'autre, existe chez les chevaux et est un élément dont il faudra tenir compte au moment de l'interprétation d'un résultat positif. Un titre même élevé en anticorps n'est pas suffisant pour orienter le diagnostic vers une infection active. Le diagnostic clinique de borréliose doit être évalué en rassemblant une symptomatologie suggestive, un historique d'exposition aux tiques et l'exclusion d'autres hypothèses diagnostiques (Divers *et al.* 2012). Le fait d'augmenter la probabilité prétest en veillant à ne tester que des chevaux suspects de borréliose, sera un autre élément important qui permettra d'augmenter la confiance qu'il y aura lieu d'accorder à une sérologie positive. Nous illustrerons ceci à l'aide des concepts de valeur prédictive des tests dans la deuxième partie de ce travail.

Les tests IF et ELISA comportent chacun des avantages et des inconvénients et leur valeur diagnostique respective mise en avant dans la littérature a souvent été évaluée dans le cadre de leur commercialisation, ce qui doit inciter à la prudence. Nous reviendrons plus en détail sur ces publications dans la deuxième partie consacrée à l'étude comparative des tests sérologiques. Chez l'homme, les deux techniques restent les tests de choix utilisés comme tests de première ligne. L'utilité des tests sérologiques dans le diagnostic de la maladie de Lyme ne dépend pas tant de la technique choisie, IF ou ELISA, mais elle sera par contre en grande partie déterminée par la population sur laquelle le test sera utilisé (Leeftang *et al.* 2016). L'avantage qu'il est possible de donner à une technique ou à une autre dépend également du seuil utilisé pour l'interprétation des résultats (Johnson 2011). Un des avantages de la technique IF est d'attribuer une réponse quantitative, mais un de ses inconvénients est le manque de répétabilité et reproductibilité rencontré en pratique, essentiellement lié à une fluorescence présente en « bruit de fond ». Il est souvent difficile à distinguer de la fluorescence ciblée contre les spirochètes qui composent la lame.

En médecine humaine, c'est une procédure à deux tests qui est recommandée (Johnson *et al.* 2011, Rizzoli *et al.* 2011, CDC 2016). En cas de résultat positif au test de première ligne ELISA ou IF, il est recommandé de réaliser un test de seconde ligne de type western blot (WB). Les antigènes utilisés dans les techniques de WB sont en général les mêmes que ceux qui sont intégrés dans les techniques

ELISA et ils doivent être adaptés aux génotypes locaux de *Borrelia* (Johnson 2011), mais dans la technique WB les différents antigènes sont séparés sur un support solide de façon à pouvoir révéler la complexité et la spécificité de la réponse immunitaire. Le CDC a émis depuis plusieurs années des critères standardisés pour l'interprétation de réactivité des WB utilisés en médecine humaine. La réponse immunitaire varie en fonction de son stade et est également variable d'une espèce à l'autre de sorte qu'en médecine vétérinaire, il est nécessaire de se baser sur des critères spécifiques par espèce mis au point par les producteurs des kits WB au cours de l'étude de validation. L'absence de diagnostic de certitude et la complexité de la réponse immunitaire rend cette validation difficile (Johnson 2011). L'interprétation des bandes de réaction des WB reste un point délicat auquel nous avons également été confrontés au cours de cette étude.

D'autres tests sérologiques ont été développés en médecine vétérinaire mais ces tests ne sont pas utilisés en routine par les laboratoires vétérinaires belges. Il s'agit entre autres des tests rapides de type qualitatifs qui détectent les anticorps de type C6. Ces tests sont disponibles chez le chien mais leur utilité chez le cheval a été décrite par plusieurs auteurs (Hansen *et al.* 2010, Maurizi *et al.* 2010). Des tests sérologiques de type multiplex, dont la sensibilité analytique s'avère supérieure aux tests ELISA classiques ont également été développés chez le cheval. Ceux-ci ont la particularité de détecter les anticorps plus précocement et de pouvoir distinguer des anticorps de type vaccinaux des anticorps de type infectieux (Wagner *et al.* 2011). Ces tests ne sont pas utilisés en Wallonie.

D'autres méthodes de diagnostic sont décrites tant chez l'homme que chez les chevaux. La PCR qui consiste à isoler et répliquer l'ADN de l'agent pathogène est, avec la culture, le meilleur test pour confirmer un diagnostic de borréliose. Ces outils sont d'une valeur inestimable en recherche, tant pour l'isolement des souches de *Borrelia* que pour la documentation des cas cliniques de maladie de Lyme, mais leur faible sensibilité en fait des outils difficilement utilisables en diagnostic de routine dans le cadre du diagnostic (Center of Disease Control and Prevention 2016). La sensibilité des tests PCR varie fortement selon le type de prélèvement soumis. Elle est ainsi par exemple chez l'homme atteint d'érythème migrant de 18 % lorsque elle est réalisée sur sang contre 64% sur des fragments de peau. La sensibilité la plus élevée est décrite lorsque l'analyse est réalisée sur liquide synovial en cas d'arthrite.

Le traitement de la maladie de Lyme est également un sujet sur lequel il existe de nombreuses controverses en médecine humaine. En effet, alors qu'il n'y a pas d'évidence de l'influence des traitements antibiotiques prolongés sur le cours naturel de la maladie (Johnson 2011, Berende *et al.* 2016), des traitements de longue durée et récurrents sont souvent mis en place chez l'homme et les conséquences, tant au niveau individuel qu'en santé publique peuvent être importantes (Borchers *et al.* 2015, De Wilde *et al.* 2016). Dans une étude récente dont les résultats ont été publiés dans le *New England Journal of Medicine* en mars 2016, Berende *et al.* n'ont observé aucun effet bénéfique

supplémentaire apporté par un traitement de longue durée (12 semaines) comparé au traitement de courte durée (2 semaines) chez des patients qui ont des symptômes persistants attribués à la maladie de Lyme (Berende *et al.* 2016).

Plusieurs protocoles sont décrits pour le traitement de la maladie de Lyme chez les chevaux. L'administration d'oxytetracycline 6.6 mg/kg IV 2X/jour constitue le traitement qui semble le plus efficace chez le cheval (Chang *et al.* 2005). L'administration de doxycycline 10 mg/kg PO 2X/jour ou de ceftiofur 2.2 mg/kg IM 2X/jour constituent des alternatives qui semblent moins efficaces mais largement répandues, en tous cas en ce qui concerne la doxycycline, étant donné son mode d'administration per os plus pratique sur le terrain (Reed et Toribio 2004). Son administration parentérale présente par contre des risques de cardiotoxicité (Amory *et al.* 2014). La durée idéale de traitement n'est pas connue mais un traitement de 3 à 4 semaines est préconisé par certains auteurs (Chang *et al.* 2005).

Enfin, il est important de rappeler que les mesures de prévention telles que la protection des zones exposées constitue la première mesure mise en avant dans les campagnes de santé publique. Comme elle n'est pas applicable chez les chevaux, c'est vers l'utilisation de répulsifs et d'acaricides que certains auteurs conseillent de s'orienter (Butler *et al.* 2005). Cependant, aucun acaricide n'a été enregistré chez le cheval en Belgique et les répulsifs sont peu efficaces (Amory *et al.* 2014).

Séroprévalence de *Borrelia burgdorferi* chez les chevaux non suspects de Lyme en Wallonie

1. Introduction

L'objectif de cette partie de l'étude est de déterminer la prévalence des anticorps *Borrelia burgdorferi* chez les chevaux vivant en Wallonie. Suite au mode de vie des chevaux et du temps qu'ils passent en extérieur ils sont fortement exposés au risque de morsure par tique et par conséquent à l'infection des pathogènes transmis par ces derniers. L'espèce équine jouerait par ailleurs un rôle indirect non négligeable dans le cycle enzootique de la borréliose (Laus *et al.* 2013). Les équins représentent, en effet, un hôte intéressant pour le vecteur, *Ixodes ricinus*, assurant ainsi le maintien de la population de tiques et la dissémination de ceux-ci et de leurs pathogènes associés dans l'environnement. En raison de cette association étroite avec le vecteur et du fait qu'ils partagent souvent leur habitats avec l'homme, les chevaux ont, par plusieurs auteurs, été proposés comme modèle valide d'évaluation du risque de maladie de Lyme chez l'homme (Claerebout *et al.* 2013, Little *et al.* 2010, Goossens *et al.* 2001). La réponse immunitaire que les chevaux développent contre *Borrelia burgdorferi* permet en effet, au travers des études de séroprévalence, d'évaluer indirectement les fluctuations spatiotemporelles du niveau du risque d'infection chez l'homme (Laus *et al.* 2013).

Connaitre la séroprévalence des anticorps *Borrelia burgdorferi* chez les chevaux est par ailleurs essentiel pour pouvoir interpréter les résultats des tests sérologiques demandés dans le cadre de l'aide au diagnostic des chevaux suspects de maladie de Lyme. Le taux de prévalence est en effet une information utile pour évaluer la valeur prédictive des tests de laboratoire lorsque ceux-ci sont utilisés à des fins diagnostiques (Hjetland *et al.* 2014, Johnson 2011, Vestrheim *et al.* 2016).

Les taux de séroprévalence rapportés chez les chevaux au cours de ces dix dernières années dans différents pays européens, sont extrêmement variables, s'échelonnant entre 7 et 60 % (Ebani *et al.* 2012, Hansen *et al.* 2010, Kiss *et al.* 2011, Laus *et al.* 2013, Maurizi *et al.* 2010, Stefanicova *et al.* 2008). Outre le fait de refléter le niveau d'exposition, cette variabilité peut probablement aussi être expliquée par des techniques sérologiques et des seuils différents utilisés pour ces études ainsi que par la méthode d'échantillonnage (taille et critères d'inclusion/exclusion) utilisée.

A notre connaissance, aucune recherche n'a été réalisée pour évaluer la séroprévalence des anticorps *Borrelia burgdorferi* chez les chevaux résidant en Wallonie. Celle-ci a par contre été étudiée en 2006 chez les chevaux vivant dans le Nord de la Belgique par Moyaert *et al.* et a été estimée à 36 %.

Les résultats de notre étude de séroprévalence seront discutés à la lumière des taux observés dans le Nord du pays et dans les autres pays d'Europe.

Conscients que l'absence de « gold standard » rend l'interprétation des études épidémiologiques difficile (Perronne 2014 ; Wagner *et al.* 2011), il nous a paru important de compléter cette étude de séroprévalence par l'évaluation de la valeur diagnostique du test ELISA utilisé dans l'étude de séroprévalence. Ceci fera l'objet de la seconde partie de ce travail.

2. Matériel et méthode

Population étudiée

La population cible vise les chevaux vivant en Wallonie. Le nombre de chevaux recensés en 2014 auprès de la Confédération Belge du Cheval (CBC) résidant en Wallonie était de 73772.

Nous avons fait le choix de sélectionner de façon uniforme le nombre de sérums par province afin que les sérums issus des provinces où la densité de population équine est plus basse ne soient pas sous-représentés dans notre échantillon. C'est par exemple le cas de la province du Luxembourg où vivent moins de chevaux que dans le Hainaut mais où l'environnement est particulièrement propice à la présence de tiques. Notre souhait était ainsi de calculer une séroprévalence avec la même précision par province et de ne pas sous-estimer la séroprévalence en Wallonie en raison d'une population d'équidés plus faible dans les régions géographiques où le risque de contact avec des tiques infectées pourrait être plus élevé. Afin d'obtenir une séroprévalence représentative pour l'ensemble de la Wallonie, les résultats obtenus par province ont ensuite été pondérés par la densité de population équine par province.

Calcul de la taille d'échantillon

Le calcul de la taille minimale de l'échantillon a été réalisé selon la formule suivante:

Taille de l'échantillon n :
$$n = \frac{Z_{1-\alpha/2}^2 pq}{c^2}$$

où:

$Z_{1-\alpha/2}$ = valeur $Z_{1-\alpha/2}$ (ex. $Z_{0.05} = 1.96$, la valeur de Z requise pour un niveau de confiance 95 %)

p = estimation à priori de la prévalence (valeur entre 0 et 1)

$q = 1 - p$

c = marge d'erreur (aussi appelée précision de l'estimation), égal à $\frac{1}{2}$ de l'intervalle de confiance

Etant donné la taille de la population élevée (plus que 5000 chevaux), il n'est pas nécessaire d'ajouter un facteur de correction pour une population finie.

En l'absence de chiffres disponibles pour la séroprévalence de la maladie de Lyme chez les chevaux en Wallonie et au vu de la variabilité des résultats de séroprévalence dans les différentes études

réalisées chez des chevaux en Europe, nous avons calculé notre échantillon sur base des résultats de notre étude préliminaire (Amory *et al.* 2014) qui a mis en évidence une séroprévalence de 22 % (n=67). En calculant la taille d'échantillon sur base d'une prévalence de 20 %, le nombre de prélèvements nécessaires est de 246 et pour une prévalence de 30 %, le nombre de prélèvements nécessaire est de 321. Nous avons analysé dans le cadre de cette étude un échantillon de 303 sérums collectés entre mai 2014 et avril 2016.

Critères de sélection

Nous avons inclus dans notre étude les sérums de chevaux ne présentant pas de symptômes suspects de maladie de Lyme. Ce critère a été vérifié à l'aide d'un questionnaire ou de la lecture du dossier clinique informatisé. Nous avons réalisé un échantillon de convenance veillant à obtenir une couverture géographique de la Wallonie la plus complète possible. Dans les provinces pour lesquelles un nombre excédant de sérums était disponible, ceux-ci ont été choisis en fonction des entités administratives afin de veiller à répartir au mieux les sérums, même à l'intérieur de chaque province.

Le questionnaire

Pour chaque cheval prélevé, un questionnaire a été complété avec son propriétaire (annexe 2). Ce questionnaire a été construit sur base des variables que nous souhaitions récolter concernant la démographie (sexe, âge et race du cheval), la localisation de la prairie où avait pâturé le cheval durant les 12 derniers mois (province et code postal), le relevé par le propriétaire d'exposition aux morsures de tiques ainsi que la présence ou non des symptômes qui auraient pu être suspects de maladie de Lyme dans les 12 derniers mois. Le questionnaire comprenait des questions fermées ou semi-ouvertes élaborées sur base d'un questionnaire utilisé dans la littérature (Egenvall *et al.* 2001). Il a été testé à l'occasion de l'étude préliminaire (n=67 chevaux).

Les sérums

Au total, 412 sérums ont été collectés à la clinique équine de la Faculté vétérinaire. Ils faisaient partie d'une sérothèque propre à la clinique et ont été prélevés dans le cadre de l'examen clinique des chevaux hospitalisés ou chez des chevaux présentés en consultation à la clinique. Le surplus de ces sérums a été allquoté et congelé à -80°. En complément de ces sérums, 148 autres sérums ont été prélevés sur des chevaux sains sur le terrain avec l'accord de leur propriétaire entre mars et avril 2016 dans le but de parvenir à une couverture géographique la plus complète possible des différentes provinces de Wallonie. Ces sérums ont été congelés à -20° et transportés sur glace au laboratoire.

Les questionnaires des sérums disponibles dans la sérothèque de la clinique équine ont été analysés afin de sélectionner les sérums qui correspondaient aux critères de sélection qui étaient, d'avoir été prélevés sur des chevaux dont les prairies de pâturage au cours des 12 derniers mois étaient situées

dans une des 5 provinces de Wallonie et de ne pas avoir présenté de signes suspects de maladie de Lyme au cours des 12 derniers mois. La qualité des sérums disponibles a également été évaluée de façon à exclure les sérums lipémiques ou hémolysés.

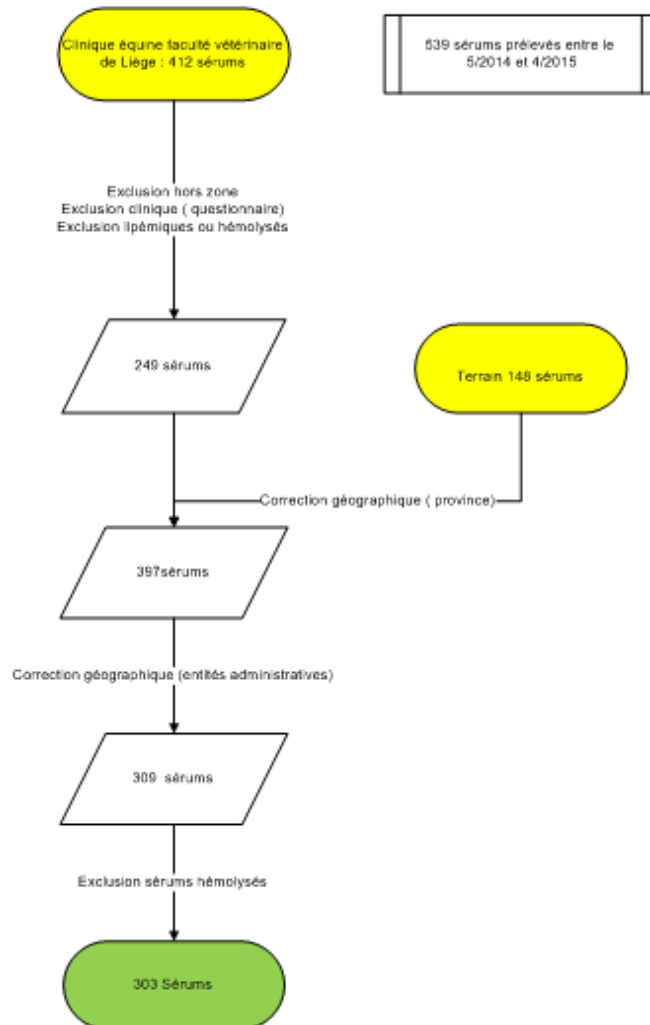


Figure 4 : diagramme de flux de la sélection des sérums pour l'étude de séroprévalence *Borrelia burgdorferi* chez les chevaux non suspects de Lyme en Wallonie

Les 303 sérums qui ont finalement été retenus pour être testés pour la présence de *Borrelia burgdorferi* sont ceux qui répondaient à ces critères et qui, dans chaque province, étaient les mieux répartis dans les différentes entités administratives afin de garantir une couverture géographique la plus complète possible.

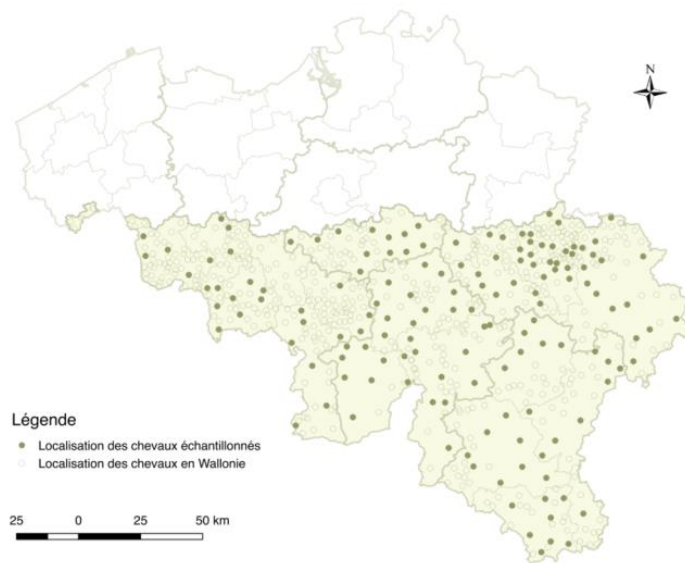


Figure 5 : Localisation des communes ayant des chevaux recensés en Wallonie (CBC 2014) et des communes où étaient localisés les chevaux inclus dans l'échantillon des sérums analysés pour la mise en évidence d'anticorps *Borrelia burgdorferi*

Analyse sérologique des échantillons

Les 303 sérums ont été analysés avec le test ELISA (Testkit *Borrelia burgdorferi* Veterinär ELISA, Fa. Genzyme Virotech) au laboratoire départemental Frank Duncombe (CAEN, France). Le test a été interprété selon les recommandations du fabricant. Le test ELISA est considéré négatif lorsque < 8 VE (Virotech Einheiten), douteux lorsque entre 8 et 12 VE, et positif lorsque > 12 VE.

Traitement des données

Les données d'identification et les variables étudiées ont été encodées dans une base de données Access et exportées en Excel. La variable « résultat sérologique » a été binarisée au seuil « douteux ». L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SAS (SAS Institute, USA). L'association entre la présence d'anticorps *Borrelia burgdorferi* et les variables explicatives que nous souhaitons analyser a été calculée au moyen d'un test Chi2 pour les variables catégorielles (mois et année de prélèvement, province de pâturage) et par un test Mann W pour l'âge. L'effet des variables explicatives pour lesquelles une association a pu être observée au seuil $p < 0,4$ a ensuite été évalué à l'aide d'un modèle de régression logistique binaire multivarié.

Contrôle qualité : une fois la base de données complétée, toutes les variables ont été vérifiées sur base du questionnaire (variables démographiques : âge, année de prélèvement, mois de prélèvement, province) et sur base des protocoles de réponse originaux du laboratoire (résultat sérologique).

3. Résultats

Echantillon

La table 1 reprend la description de notre échantillon composé de 303 sérums prélevés entre avril 2014 et avril 2016 sur des chevaux vivant en Wallonie non suspects de maladie de Lyme.

Table 1 : Description de l'échantillon

Variables	Effectifs (%)	Moyenne±SD
Sexe		
Etalon	37	12,20%
Jument	139	45,90%
Hongre	127	41,90%
Age (années)		12,1±6,9
Année du prélèvement		
2014	99	32,70%
2015	57	18,80%
2016	147	48,50%
Répartition des prélèvements par mois		
Janvier	11	3,60%
Février	4	1,30%
Mars	57	18,8%
Avril	122	40,30%
Mai	7	2,30%
Juin	26	8,60%
Juillet	23	7,60%
Août	15	4,90%
Septembre	12	4,00%
Octobre	26	8,60%
Novembre	0	0%
Décembre	0	0%
Répartition des chevaux par province		
Brabant wallon	63	20,80%
Liège	61	20,10%
Namur	58	19,10%
Mons	62	20,50%
Luxembourg	59	19,50%
Résultats ELISA		
Négatif	235	77,60%
Positif	68	22,4%

Résultats sérologiques

La prévalence d'anticorps *Borrelia burgdorferi* sur notre échantillon était de 22,44 %. La distribution des résultats sérologiques en fonction des communes dans lesquelles pâturaient les chevaux est reprise dans la figure 6.

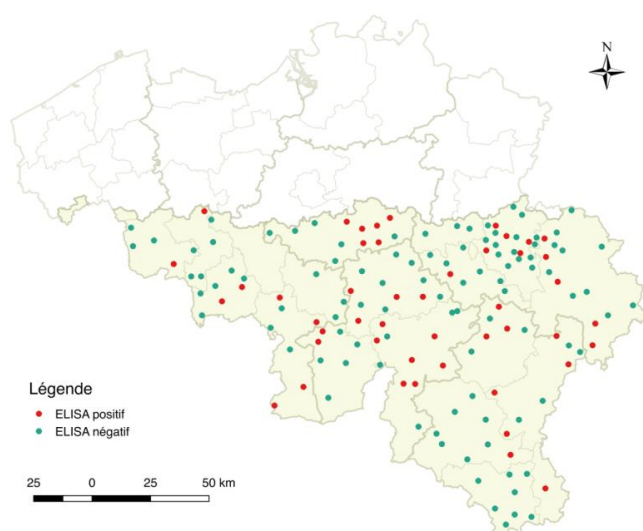


Figure 6 : Localisation des communes où résidaient les chevaux inclus dans l'échantillon selon les résultats sérologiques *Borrelia burgdorferi* positifs ou négatifs.

La prévalence observée dans notre étude a, dans un deuxième temps, été pondérée par province en fonction du nombre de chevaux recensés afin que la prévalence estimée pour la Wallonie tienne compte de la densité de la population équine par province (table 2). La pondération a entraîné un changement de moins d'un dixième de pourcent par rapport au taux de prévalence avant pondération et est de 22,35%.

Table 2 : Répartition du nombre de chevaux recensés en Wallonie (CBC 2014) et des résultats sérologiques *Borrelia burgdorferi* par province

	Nbre de Prél.	Nbre de positifs	% de positifs	Nbre de chevaux	% de chevaux
Brabant	63	12	19	8653	12
Namur	58	18	31	11930	16
Liège	61	11	18	19114	26
Luxembourg	59	13	22	10898	15
Hainaut	62	14	23	23177	31
	303	68	Moy:22,44%	73772	100

Le taux de résultats positifs le plus élevé a été mis en évidence en province de Namur (31 %) et le taux le plus bas, en province de Liège (18 %) mais aucune association significative n'a pu être mise en évidence entre la province où résidait les chevaux et le taux de résultats positifs (p-valeur=0,468).

Les taux de séroprévalence par année étaient respectivement pour 2014, 2015 et 2016 de 26 %, 23 % et 20 % mais cette différence ne s'est pas avérée statistiquement significative (p-valeur=0,483). C'est durant les mois de mars (21,05 %), avril (21,31 %), juillet (21,74 %), août (20 %), septembre (33,33 %) et octobre (50 %) que les taux de résultats positifs étaient les plus élevés, mais l'association entre le mois de prélèvement et la proportion de résultats positifs ne s'est pas non plus avérée significative au seuil de 0,05 (p-valeur= 0,0536). Nous avons néanmoins décidé d'intégrer cette variable dans le modèle de régression et d'évaluer l'effet de l'âge du cheval et du mois de prélèvement sur la présence d'anticorps *Borrelia burgdorferi* à l'aide d'une régression logistique binaire multivariée :

```
proc logistic data=BDSeroprevalenceCVNonSuspects descending ; class MoisP (ref= '1')/param=ref ;
```

```
model ELISAbin=Age MoisP/link=logit ; run ;
```

Une augmentation de la séroprévalence avec l'âge du cheval a pu être mise en évidence, et ce, même après ajustement sur le mois de prélèvement (Odd Ratio : 1,047, IC 95 % : 1,005-1,090). Aucun effet du mois de prélèvement, après ajustement sur l'âge, n'a cependant pu être mis en évidence (p-valeur=0,144).

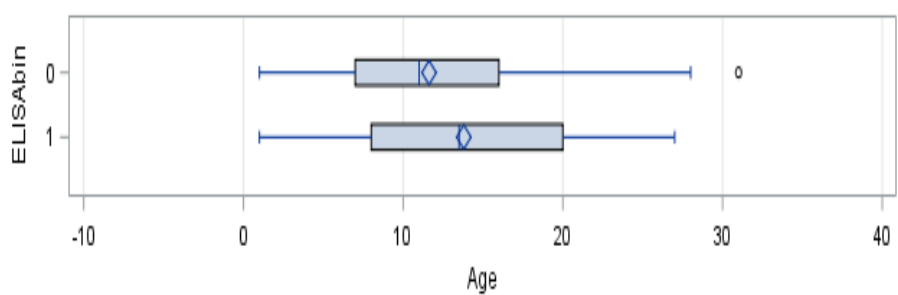


Figure 7: association entre l'âge du cheval et le taux de séroprévalence *Borrelia burgdorferi* (SAS output)

4. Discussion

Le taux de séroprévalence *Borrelia burgdorferi* observé chez les chevaux vivant en Wallonie est de 22 %. Ce taux est inférieur au taux de séroprévalence mis en évidence dans le Nord du pays (36 %) par Moyaert *et al.* en 2006. Dans l'échantillon réalisé en Flandre (n=100) les sérums avaient été sélectionnés dans la sérothèque de la clinique équine de la faculté vétérinaire de Gand entre décembre 2002 et septembre 2005 et seuls des chevaux ne présentant pas de signes suspects de maladie de Lyme avaient, comme dans notre étude, été inclus. Le taux de prévalence des anticorps *Borrelia burgdorferi* observé dans notre étude est par contre proche de celui de 24 % rapporté en Italie (Ebany *et al.* 2012), ou de 29 % rapporté au Danemark (Hansen *et al.* 2010). La mise en évidence d'anticorps chez des

chevaux non suspects de borréliose est une donnée épidémiologique dont il faudra tenir compte lors de l'interprétation d'un résultat de sérologie positif chez un cheval suspect de borréliose.

Malgré des taux de prévalence qui à première vue semblaient différer d'une province à l'autre, aucune association significative n'a pu être mise en évidence entre le taux de résultats positifs et la province où les chevaux pâturaient, et ceci malgré les efforts qui ont été faits pour assurer une couverture géographique homogène lors de l'échantillonnage. Ceci va à l'encontre des données épidémiologiques et est particulièrement étonnant si on considère le biotope des tiques et l'influence que les hôtes réservoirs peuvent avoir dans le maintien de la population des tiques (Medlock *et al.* 2013). Ces données vont également à l'encontre des données de distribution spatiale des taux d'incidence annuels de maladie de Lyme chez l'homme rapportés par Linard *et al.* entre 1994 et 2004 pour la Wallonie (2007) où une concentration plus élevée a été observée pour la provinces du Brabant wallon et la province de Namur (Linard *et al.* 2007). Il est à noter que la taille de notre échantillon ($n=303$) a été calculée afin de pouvoir obtenir une séroprévalence pour la Wallonie mais que le nombre de sérums par province ($58 < n < 63$) n'a pas été calculé de façon proportionnelle aux nombre de chevaux par province. La question de savoir si cette absence d'association entre la province et le taux de séroprévalence implique une dispersion voire une généralisation des zones à risque pour le cheval et pour l'homme est dans ce contexte une question délicate.

Aucune association significative n'a été mise en évidence entre l'année de prélèvement et le taux de résultats positifs pour *Borrelia burgdorferi*. D'un point de vue épidémiologique et santé publique, même si la période de 3 ans sur laquelle portent nos résultats est très limitée, cette observation va dans le même sens que la tendance relativement stable du nombre d'infections décrites chez l'homme en Belgique au cours des dix dernières années (Overlegorganen gezondheid België 2015).

Dans notre étude, de la même façon que dans l'étude réalisée dans le Nord du pays, aucun effet significatif du mois de prélèvement n'a été observé.

L'effet significatif de l'âge retrouvé sur notre échantillon avait également été mis dans d'autres études épidémiologiques notamment en Italie (Ebani *et al.* 2012) et dans le Nord du pays (Moyaert *et al.* 2006). L'âge s'avère donc un élément dont il sera important de tenir compte lorsqu'on évalue, dans le cadre du diagnostic, la présence d'anticorps chez un cheval suspect de maladie de Lyme. Les anticorps de type IgG apparaissent en effet entre 3 à 8 semaines après infection par *Borrelia* et peuvent persister des mois, voire des années (Butler *et al.* 2005) de sorte qu'un résultat positif chez un cheval plus âgé n'aura pas la même valeur diagnostique qu'un résultat positif chez un jeune cheval.

5. Limites et forces de l'étude

Le soin apporté à répartir l'échantillon de la façon la plus complète possible d'un point de vue géographique est un point fort de cette étude, même si malgré cela, aucune association statistiquement

significative n'a pu être mise en évidence entre le taux de résultats positifs et la province où résidaient les chevaux. Il faut cependant rester prudent et tenir compte du fait que les provinces sont des entités larges et variées d'un point de vue du biotope et de la démographie des tiques et des espèces hôtes.

Si nous avons mis tout en œuvre pour garantir une bonne couverture géographique dans notre échantillon, il ressort par contre des statistiques descriptives que la répartition par année et par mois n'a pas été réalisée de façon homogène. Les contraintes logistiques et de temps sont essentiellement à l'origine de cette répartition peu homogène dans le temps qui peut expliquer pourquoi aucune association statistiquement significative n'a pu être mise en évidence entre l'année ou le mois de prélèvement et le taux de résultats positifs observés pour notre échantillon.

Etude comparative des tests sérologiques *Borrelia burgdorferi* ELISA et IF

1. Introduction

L'objectif de la deuxième partie de ce travail est double : il est d'une part d'évaluer l'efficacité des tests sérologiques de borréliose lorsque ceux-ci sont utilisés à des fins diagnostiques et d'autre part, d'interpréter au mieux les résultats de l'étude de séroprévalence réalisée dans la première partie

Les tests sérologiques borréliose IF et ELISA sont les deux tests sérologiques de première ligne les plus couramment utilisés par les vétérinaires belges comme aide au diagnostic lorsqu'un cheval est suspect de maladie de Lyme. Ces tests seront évalués par rapport au test de seconde ligne, le WB, utilisé dans le cadre de cette étude comme standard de référence. Connaître la valeur diagnostique des tests sérologiques de la borréliose constitue en effet un préliminaire indispensable pour interpréter correctement les résultats positifs et négatifs et pour aider les vétérinaires praticiens à utiliser ces tests de façon critique, selon les principes d'« evidence based veterinary medicine » et permettre la prise en charge des chevaux suspects de maladie de Lyme en veillant à l'utilisation raisonnée des antibiotiques.

Evaluer la capacité d'un résultat de test positif ou négatif à prédire de façon précise l'exposition ou l'infection d'un animal ou d'une population animale à un agent pathogène constitue une étape fondamentale dans le processus de validation d'un test. C'est aussi cette capacité qui déterminera le niveau de confiance qu'il y aura lieu d'accorder dans la performance d'un test et dans sa capacité à fournir des inférences diagnostiques utiles selon l'usage auquel il est destiné (OIE 2013). L'OIE distingue d'une part les paramètres de performance analytique d'un test qui sont sa répétabilité, sa reproductibilité, sa sensibilité et sa spécificité analytique et d'autre part, les paramètres de performance diagnostique de ce test qui sont sa sensibilité et sa spécificité diagnostique.

Pour des raisons de contrainte financière et de temps, ce sont uniquement les paramètres de performance diagnostique qui seront évalués dans le cadre de ce travail à savoir la sensibilité et la spécificité diagnostique ainsi que la valeur prédictive positive et négative. La reproductibilité ne sera abordée que brièvement dans la discussion.

La sensibilité et la spécificité diagnostique d'un test sont des caractéristiques importantes qui détermineront son efficacité. Il est cependant important de rappeler que les paramètres de sensibilité et de spécificité diagnostique d'un test sont étroitement liés non seulement aux paramètres de validité analytique (la capacité du test à distinguer spécifiquement les analytes recherchés et la limite de détection), mais dépendent également de la population dans laquelle le test sera utilisé (OIE 2013). Lorsque l'on veut en pratique interpréter le résultat d'un test, ce seront les valeurs prédictives positives et négatives qui vont de façon concrète pouvoir donner une indication de la confiance que le clinicien

pourra accorder au résultat positif ou négatif du test. Les valeurs prédictives positives et négatives sont influencées par la prévalence de la maladie dans la population (Sergeant et Perkins, 2015). Des tests de laboratoires avec une excellente spécificité et sensibilité diagnostique n'auront pas une valeur prédictive utile s'ils ne sont pas utilisés correctement. C'est ainsi que dans une étude réalisée sur le diagnostic de la maladie de Lyme chez l'homme, Johnson (2011) décrit comment le fait de tester des patients qui ont peu de probabilité d'être atteints de borréliose risque de générer plus de faux positifs que de vrais positifs.

La façon dont ont été sélectionnés les sérums pour l'évaluation de la performance d'un test sérologique dans le cadre de sa validation et de sa mise sur le marché est une étape délicate et va influencer les résultats (Johnson 2011). En l'absence de « gold standard », comme c'est le cas pour la maladie de Lyme, ceci représente une étape très difficile. Force est de constater que les sensibilités et les spécificités annoncées par les fournisseurs des kits diagnostiques manquent parfois d'objectivité et les seuils proposés ne donnent pas toujours la sensibilité et la spécificité souhaitée. Pour le test borréliose IF, on peut ainsi observer que le seuil de 1/64 avancé comme seuil de positivité par le producteur (notice Biopronix, fluo *Borrelia burgdorferi* horse) amènerait à conclure à une séroprévalence de plus de 97 % (annexe 1). C'est une séroprévalence peu réaliste qui ne correspond pas aux différentes séroprévalences décrites dans la littérature et qui sont précisées dans la première partie de ce travail. Sans données objectives probantes, il n'était cependant pas justifié scientifiquement de modifier les seuils annoncés par le producteur et pour pallier à ce cut-off visiblement trop bas avancé par le producteur. La décision a été prise au sein du laboratoire réalisant le test d'insérer un commentaire sur les protocoles de réponse incitant les vétérinaires à la prudence lors de l'interprétation des résultats positifs. Ce commentaire suggère que les résultats 1/64, 1/128 et 1/256 soient jugés non significatifs. Il y est d'autre part précisé que les résultats doivent être évalués en parallèle avec la clinique et l'historique d'exposition aux tiques. Il est aussi conseillé de contrôler les résultats de sérologie positifs par un sérum couplé ou un WB. Cette pratique est malheureusement encore trop rarement appliquée. Une approche largement répandue sur le terrain, mais peu justifiable scientifiquement, consiste en effet vu l'absence de signes cliniques spécifiques chez les chevaux suspects de maladie de Lyme à réaliser un test sérologique et à mettre en place une antibiothérapie si le résultat de cette sérologie est positive.

La spécificité et la sensibilité annoncée par le producteur du kit ELISA (notice *Borrelia burgdorferi* Veterinar ELISA) utilisé dans l'étude de séroprévalence sont respectivement de 96 % et de 100 %. L'analyse de la méthodologie utilisée pour la détermination de ces seuils par le producteur permet de constater que ces valeurs ont été déterminées par comparaison au WB sur un échantillon de 119 chevaux dont seulement 3 étaient positifs. Aucune donnée clinique n'est cependant disponible pour ces cas positifs. La valeur scientifique de ces paramètres de validité et leur utilisation pour l'interprétation des résultats sont dès lors également questionnables.

Une recherche bibliographique réalisée sur la valeur diagnostique des tests sérologiques IF et ELISA n'a pas non plus permis de trouver de données fiables pour les paramètres de validité ou les seuils à utiliser. De nombreuses publications ont été réalisées à ce sujet, mais celles-ci favorisent tantôt l'un et tantôt l'autre test. L'analyse de ces publications permet de se rendre compte que celles-ci doivent être interprétées avec précaution car elles font l'objet de nombreux biais et conflits d'intérêts. Ainsi par exemple, dans un article publié en 2002 par Dziercecka *et al.*, les auteurs concluent dans le cadre d'une étude de validation d'un nouveau test ELISA comparé à un test IF ainsi qu'à un autre test validé de type ELISA, que l'IF présente un pourcentage plus élevé de faux positifs. Il apparaît au vu de la méthodologie utilisée qu'un biais existe car s'il est possible en l'absence d'indépendance des tests utilisés de décrire leur concordance entre eux, il est impossible de savoir si cette concordance veut dire que l'un ou l'autre test est meilleur que l'autre. Deux tests peuvent en effet avec une concordance parfaite être tous les deux aussi mauvais l'un que l'autre (Sergeant et Perkins 2015). Il en va de même pour différents articles publiés par la suite dans le cadre de la validation de nouveaux tests IF ou ELISA qui mettent en avant la sensibilité et la spécificité d'une méthode par rapport à l'autre selon celle qui a été étudiée pour la validation. En 2008, Johnson publie dans le cadre de la validation d'un nouveau test ELISA, un article dans lequel il met en avant la spécificité de 100 % de ce nouveau test. Dans cette étude, les 220 sérums sélectionnés provenaient de 23 poneys infectés expérimentalement par *Borrelia burgdorferi* mais n'ayant montré aucun signe clinique et de 4 poneys témoins négatifs. L'analyse portait sur des sérums prélevés chez un même animal à différents moments après l'infection expérimentale. La transposition des données de validité dans un contexte clinique peut être remise en question. Dans une étude de prévalence réalisée en 2007 en Flandre, pour citer un dernier exemple, les auteurs décrivent une spécificité et une sensibilité de 100 % pour le test ELISA utilisé, ce qui dans l'absolu serait bien sûr idéal, mais nous a paru également peu réaliste (Moyaert *et al.* 2006). La commercialisation des nouveaux tests sérologiques plus récents (Dot Blot, Multiplex ELISA, Western Blot, LIPS) et les recherches en cours sur ces tests ont également donné lieu à plusieurs publications (Chandrashekar *et al.* 2010, Maurizi *et al.* 2010, Burbelo *et al.* 2010). Dans une publication très intéressante, Wagner (2011) utilise une méthode de validation Bayésienne pour valider un nouveau test. Cette approche semble, en l'absence de « gold standard », très intéressante. L'auteur souligne dans sa conclusion que l'évaluation des valeurs diagnostiques reste un véritable challenge en l'absence d'un vrai « gold standard », résumant ainsi les difficultés rencontrées et les limites de l'évaluation de la valeur diagnostique des tests sérologiques utilisés pour la borréliose.

Au vu de ces informations très variées trouvées tant auprès des producteurs des kits diagnostiques borréliose ELISA et IF ainsi que dans la littérature, il paraissait incontournable d'évaluer les paramètres de validité de ces tests que ce soit pour leur utilisation à des fins épidémiologiques ou lorsque ceux-ci sont utilisés à des fins diagnostiques. C'est également à l'aide de ces paramètres qu'il sera possible d'illustrer, à l'aide d'exemples concrets, l'opportunité qu'ont les vétérinaires

d'augmenter la valeur prédictive positive de leurs résultats de sérologie borréliose. En veillant à tester uniquement des chevaux suspects de maladie de Lyme, ils pourront en effet augmenter la probabilité prétest qui, comme la prévalence, va influencer favorablement la valeur prédictive positive. En prenant soin de vérifier les résultats positifs par un test de seconde ligne, ils pourront améliorer sensiblement la spécificité.

2. Matériel et méthode

En l'absence de gold standard et suivant les recommandations trouvées dans la littérature, les sérums de notre échantillon ont été testés en aveugle selon la technique IF, ELISA et WB. Lorsqu'aucun « gold standard » n'est applicable ou disponible, l'utilisation du meilleur test disponible est en effet une des méthodes acceptée et parmi les plus fréquemment utilisées (OIE 2013). Le WB fait ainsi dans le cadre de notre étude office de « gold standard relatif » ou de « standard de référence » selon la dénomination conseillée (Rutjes *et al.* 2007).

Echantillon

Un échantillon de convenance de 100 sérums a été réalisé en veillant à stratifier ces sérums par rapport au taux d'anticorps borréliose IF, allant du plus faible taux (titre IF 1/64) au taux le plus élevé (titre IF 1/1024). Cette méthode a été choisie afin d'avoir un échantillon représentatif des différentes sérologies rencontrées sur le terrain. Pour des raisons de coûts supplémentaires inutiles, aucun sérum négatif en IF n'a été inclus dans cette étude comparative. En effet, à la fois les recommandations du fabricant du test et les résultats préliminaires obtenus dans une étude pilote indiquant que 100% des sérums au seuil 1/64 étaient négatifs en WB (Amory *et al.* 2014) permettaient de raisonnablement penser que ceux-ci allaient également être négatifs en WB.

Les sérums ont été sélectionnés dans la sérothèque de la clinique équine de la Faculté vétérinaire (n=53) ainsi que parmi les sérums soumis par des vétérinaires praticiens au laboratoire Synlab-Collard. Ces derniers ont été prélevés par les praticiens chez des chevaux suspects de borréliose (n=47). A l'intérieur de chaque strate, les sérums ont été sélectionnés de façon aléatoire lorsque plusieurs sérums étaient disponibles pour une même dilution. Les échantillons ont été collectés entre avril 2014 et avril 2016. Ils ont été soit analysés immédiatement, soit congelés à -20° (maximum un mois) ou à -80° (maximum deux ans).

Tests sérologiques

Chaque sérum a été analysé avec 3 tests sérologiques qui seront repris respectivement sous l'abréviation IF, ELISA, WB :

- ✱ IF : immunofluorescence (Fluo *Borrelia burgdorferi* Horse, Biopronix)
- ✱ ELISA (Testkit *Borrelia burgdorferi* Veterinär ELISA, Fa. Genzyme Virotech)
- ✱ WB : western blot (*Borrelia* vétérinaire plus OspA LINE, IgG Line Immunoblot, Sekisui Virotech GmbH)

Les analyses ont été réalisées en aveugle par des technologues différent(e)s, dans deux laboratoires différents et sur trois sites distincts (Laboratoire Synlab-Collard ; site de Liège (IF), et site d'Augsburg DE (WB, ELISA) et Laboratoire Frank Duncombe (ELISA).

L'interprétation des résultats a été réalisée selon les instructions du producteur. Le résultat du test ELISA est considéré négatif lorsque < 12 VE (Virotech Einheiten), douteux entre 8 et 12 VE et positif lorsque > 12 VE. Le résultat du test IF est répondu en titre qui correspond à la dilution la plus élevée à laquelle une fluorescence a été observée. Ces titres s'échelonnent de 1/64 à 1/1024. Les résultats du test WB sont répondu négatif, douteux (= oriente vers un contact) ou positif (= oriente vers une infection) en fonction du nombre et de l'intensité des bandes qui ont réagi (annexe 2).

Traitement des données

Les résultats ont été encodés dans une base de données Access. Ils ont ensuite été exportés en Excel et binarisés pour les différents seuils. Les résultats positifs et négatifs ont ensuite été répartis dans des tables de contingence. Ces tables ont été réalisées pour les différents seuils en IF (1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024) et en ELISA (douteux, positif) reprenant le résultat du WB comme standard de référence pour le classement des vrais et faux positifs.

La sensibilité, la spécificité, la performance, la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative ont ensuite été calculées pour les différents seuils IF et ELISA par rapport aux différents seuils du WB (douteux, positif). Les seuils du standard de référence, le WB, doivent en effet également d'être choisis en fonction de l'utilisation à laquelle est destiné le test (OIE 2013) pour pouvoir avancer une spécificité et sensibilité diagnostique des tests sérologiques IF et ELISA lorsque ceux-ci sont utilisés à des fins épidémiologiques pour mettre en évidence un contact avec *Borrelia burgdorferi* (seuil WB douteux) ou à des fins diagnostiques, pour orienter vers une infection active à *Borrelia burgdorferi* (seuil WB positif).

Contrôle qualité : l'ensemble des résultats a été vérifié sur base du protocole de réponse original du laboratoire. Pour les résultats WB, une vérification attentive nous a amené à reclasser correctement plusieurs résultats qui avaient été mal classés sur le protocole de réponse du laboratoire. Pour cette vérification nous avons tenu compte des bandes réactives et de l'algorithme de classement du producteur (annexe 3).

3. Résultats

Evaluation des paramètres de validité des test ELISA et IF lorsque ces tests sont utilisés pour orienter vers un contact avec *Borrelia burgdorferi*

Dans le but de pouvoir interpréter au mieux les résultats de l'étude de séroprévalence et de pouvoir déterminer les valeurs seuils qui donnent les meilleurs paramètres de validité lorsque les tests ELISA et IF sont utilisés à des fins épidémiologiques, nous avons comparé les résultats de ces tests pour les différents seuils de positivité, en les classant dans des tables de contingence par rapport aux résultats du test WB interprété au seuil « douteux ». Un résultat de test WB douteux oriente en effet vers un contact avec l'agent pathogène. Sur les 100 sérums analysés 24 étaient positifs en WB. Les résultats sont synthétisés dans la table 3.

Table 3 : paramètres de validité des tests IF et ELISA pour une utilisation de ces tests à des fins épidémiologiques (contact avec *Borrelia burgdorferi*) calculés par comparaison au WB (seuil douteux)

	IF seuil 1/128	IF seuil 1/256	IF seuil 1/512	IF seuil 1/1024	ELISA seuil douteux	ELISA seuil positif
Sensibilité	100%	95,83%	83,33%	58,33%	95,83%	83,33%
Spécificité	26,32%	51,32%	73,68%	92,11%	63,16%	77,63%
Efficacité	62,99%	73,57%	78,51%	75,22%	79,50%	80,48%
VPP	30%	38,33%	50%	70%	45,10%	54,04%
VPN	100%	98%	93%	87,5%	97,96%	93,65%

.VPP=valeur prédictive positive, VPN= valeur prédictive négative

Ces chiffres nous permettent d'observer que la sensibilité et la spécificité du test ELISA utilisé dans la première partie de ce travail (étude de séroprévalence) sont respectivement de 95.83 % et de 63.16 % lorsqu'à la fois les résultats du test ELISA et WB sont interprétés au seuil douteux.

On peut également observer que le test IF « performe » le mieux lorsqu'il est utilisé au seuil de positivité de 1/512. Utilisé au seuil de 1/256 on observe une sensibilité qui est plus intéressante qu'au seuil 1/512 (96 % versus 83 %) mais avec cependant une spécificité insuffisante (51 % versus 74 %). Utilisé au seuil de 1/1024 on observe une spécificité très intéressante (92,21 %) mais avec une sensibilité insuffisante (58 %).

La représentation graphique des résultats (figure 8 et 9) illustre que le choix d'un test et du seuil de positivité utilisé pour interpréter les résultats va déterminer son efficacité qui sera un compromis entre la sensibilité et la spécificité. En faisant varier les seuils on va favoriser tantôt l'une ou l'autre.

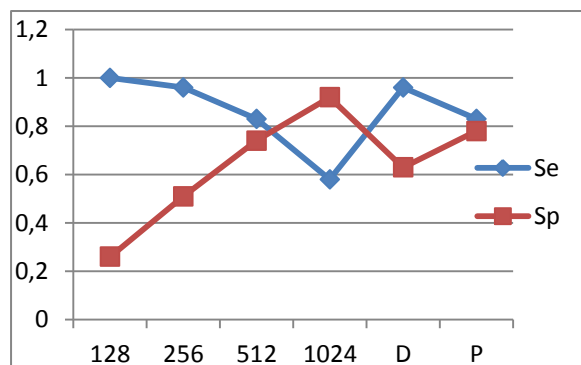


Figure 8 : Comparaison des sensibilités et des spécificités des tests IF et ELISA pour la mise en évidence des anticorps *Borrelia burgdorferi* calculées pour les différentes valeurs seuil par rapport au WB (seuil douteux)

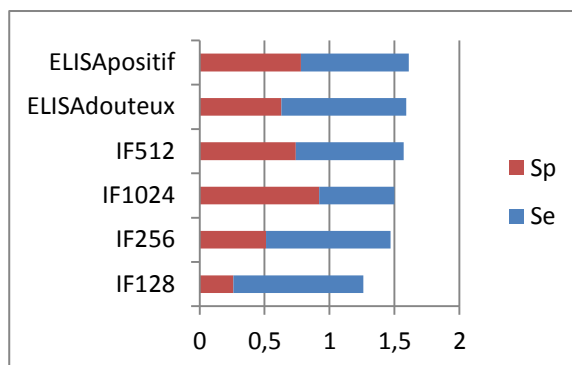


Figure 9 Représentation graphique de l'efficacité des tests IF et ELISA pour la mise en évidence des anticorps *Borrelia burgdorferi* calculée pour les différentes valeurs seuil par rapport au WB (seuil douteux) classés par ordre décroissant d'efficacité

Concordance des tests ELISA et IF

Plusieurs méthodes existent pour comparer deux tests entre eux dont le calcul du coefficient de corrélation Kappa, le calcul de la concordance générale et le calcul de la concordance proportionnelle de résultats positifs et négatifs. Chaque méthode comporte des avantages et des limites. (Powers 2014, Schvatz *et al.* 2015, Sergeant et Perkins 2015,).

Le coefficient de Kappa calculé selon la formule de Powers (2014) est de 0,70 et est, selon les critères de concordance Kappa, considéré comme étant bon. La concordance générale est de 0,85 et la concordance positive entre les résultats IF et ELISA calculée selon la formule de Cicheti et Feinstein (Sergeant et Perkins 2015) est de 0,95 (table 4).

Table 4 : Table de contingence pour le calcul de la concordance entre les résultats ELISA (seuil douteux) et IF (seuil 1/512) pour la mise en évidence des anticorps *Borrelia burgdorferi*

ELISA/IF	IF positif	IF négatif	Totaux
ELISA positif	38	13	51
ELISA négatif	2	47	49
Totaux	40	60	100
%concordance positive	0,95		
%concordance négative	0,78		

Lorsque des informations sont disponibles sur les erreurs probables de classement (et ces informations étaient accessibles en utilisant le WB comme standard de référence, il est possible de calculer la concordance positive corrigée (Rutjes *et al.* 2007).

La concordance positive corrigée qui tient compte de la probabilité d'avoir mal classé des résultats vrais et faux négatifs donne dans le cas présent un taux de concordance positive de 90.50%.

Evaluation des paramètres de validité des tests ELISA et IF lorsque ces tests sont utilisés pour orienter vers une infection active par *Borrelia burgdorferi*

Le diagnostic constitue une étape incontournable de la prise en charge d'un cheval malade et son résultat déterminera les décisions thérapeutiques. Les tests sérologiques peuvent être des outils précieux pour confirmer ou infirmer une suspicion clinique de borréliose. Connaître la valeur diagnostique des tests ELISA et IF lorsque ceux-ci sont utilisés à des fins diagnostiques est dans ce contexte essentiel. Les résultats des tests ELISA et IF ont, cette fois, été comparés aux résultats du WB au seuil positif. Un résultat WB positif oriente vers une infection active. Un résultat positif devra néanmoins être interprété en tenant compte de la clinique, de l'anamnèse et de l'exposition potentielle à des tiques.

Les résultats sont représentés en termes de taux de faux positifs et de taux de faux négatifs selon le choix de différentes valeurs seuils IF et ELISA (figure 10). La table 5 reprend les paramètres de validité pour différents seuils IF et ELISA calculés par rapport au standard de référence WB interprété au seuil positif.

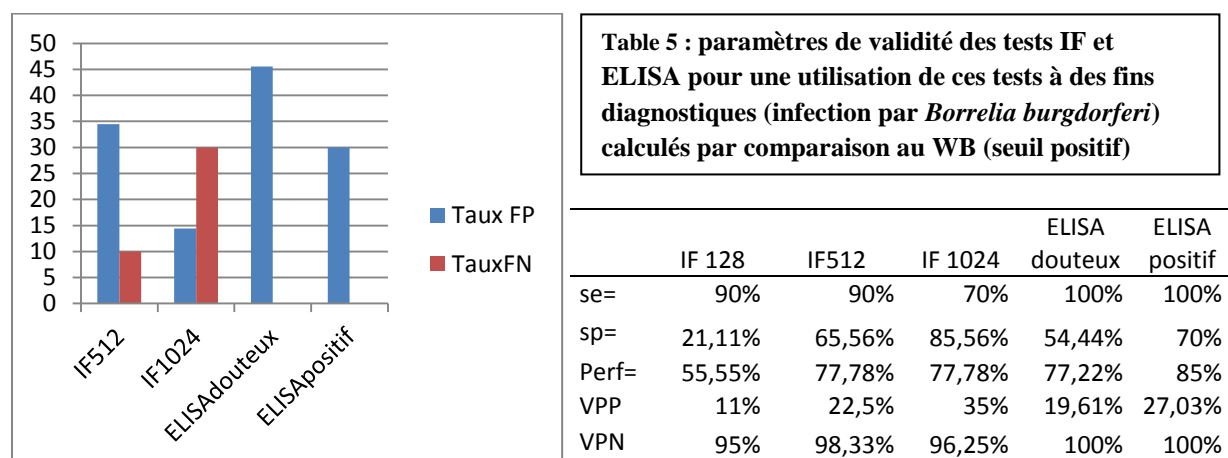


Figure 10 : représentation graphique des taux de faux positifs (FP) et faux négatifs (FN) en fonction du seuil de positivité choisi pour interpréter les résultats des tests IF et ELISA *Borrelia burgdorferi*

C'est le test IF utilisé au seuil 1/1024 qui génère le moins de résultats faux positifs (14,44 %). Il génère cependant lorsqu'il est utilisé au seuil de positivité de 1/1024, 30 % de faux négatifs. Si on utilise le seuil IF 1/512 ou les tests ELISA (seuil douteux ou positifs), on peut observer que plus de 30 voire 40 % des résultats seront des faux positifs. Aucun faux négatif n'a par contre été mis en évidence pour le test ELISA. En effet, tous les résultats négatifs en ELISA l'étaient également au WB lorsque la valeur seuil utilisé pour le WB est le seuil « positif ».

Influence de la prévalence et de la probabilité pré-test sur la valeur prédictive positive : une illustration

L'utilisation de tests de laboratoires, même lorsque ceux-ci ont une bonne spécificité et une bonne sensibilité, n'auront pas une bonne valeur prédictive positive s'ils sont utilisés avec une probabilité prétest basse (Johnson 2011).

En médecine humaine, des recommandations ont été émises pour limiter la réalisation de tests sérologiques de borréliose non justifiés. En cas de symptômes spécifiques tels que la présence d'un érythème migrant qui fait suite à une morsure par tique, les tests sérologiques sont considérés comme inutiles, car ce symptôme oriente à lui seul vers un diagnostic de borréliose avec une probabilité pré-test de plus de 80 %, probabilité à partir de laquelle, il est considéré inutile de réaliser un test (Johnson 2011, Perronne 2014). Utiliser des tests sérologiques dans la phase aigüe précoce de la maladie de Lyme risque en plus de générer des faux négatifs et aura comme conséquence de diminuer la valeur prédictive négative du test utilisé quelles que soient ses qualités analytiques. Lorsqu'un patient présente des symptômes peu spécifiques, les médecins sont par contre confrontés au même problème qu'en médecine vétérinaire et il est important que le clinicien évalue la probabilité prétest afin de déterminer s'il est, oui ou non, justifié de réaliser une sérologie borréliose.

Nous terminerons cette deuxième partie du travail par un tableau qui, à l'aide de données issues de notre étude comparative, permet de comprendre dans quelle mesure le fait d'augmenter la probabilité prétest et donc la prévalence va permettre aux praticiens d'améliorer les valeurs prédictives positives et donc la probabilité qu'un résultat positif oriente bien vers une infection.

Les valeurs de spécificité et sensibilité du test IF au seuil de 512 ont été utilisées et les conséquences ont été exprimées en termes de valeur prédictive positive dans une population fictive en faisant varier la prévalence de 10 % à 50 % (table 6) :

Table 6 : évolution des paramètres de validité du test IF utilisé au seuil 1/512 calculé par comparaison au test WB (seuil positif) pour une augmentation de la prévalence de 10 à 50%

IF/WB	WB positif	WB négatif	Totaux	IF/WB	WB positif	WB négatif	Totaux
IF positif	9	31	40	IF positif	45	17	62
IF négatif	1	59	60	IF négatif	5	33	38
Totaux	10	90	100	Totaux	50	50	100

se=	90%	se=	90 %
sp=	65,56%	sp=	65,56%
Perf=	77,78%	Perf=	77,78%
VPP	22,50%	VPP	72,58%
VPN	98,33%	VPN	86,68%

On peut observer que la valeur prédictive positive passe de 22,50 % pour une prévalence de 10 % à une valeur prédictive de 72,58 % si la prévalence est artificiellement tirée vers le haut tout en gardant les mêmes paramètres de sensibilité et spécificité du test.

4. Discussion

Le calcul des paramètres de validité des tests IF et ELISA qui sont les deux tests *Borrelia burgdorferi* les plus couramment utilisés par les vétérinaires belges, nous a permis d'observer une bonne sensibilité (96 %) du test ELISA lorsque celui-ci est interprété au seuil douteux telle que ce fût le cas dans notre étude de séroprévalence. Sa spécificité s'est avérée nettement moins bonne (66 %) et se traduit par une valeur prédictive positive qui est inférieure à 50%. Ceci nous incite à rester prudents lors de l'interprétation des résultats de notre étude de séroprévalence. En effet, en transposant les paramètres de validité calculés pour le test ELISA, à la séroprévalence observée dans l'échantillon de 303 chevaux utilisé dans la première partie du travail, le taux de séroprévalence ne serait plus de 22,44 % mais de 10,54 % .La plus grande prudence s'impose cependant pour faire cette inférence. En effet, en l'absence de gold standard les paramètres ont été calculés par comparaison au WB utilisé comme standard de référence. Dans la situation idéale le standard de référence devrait fournir une classification parfaite sans erreurs. Cependant le standard de référence ne constitue pas le « gold standard » mais la meilleure alternative disponible. Il est donc indispensable de prendre en considération la qualité de ce standard de référence. Chaque erreur de classement du standard de référence entraîne un classement erroné du résultat du test candidat que l'on évalue. Si le test de référence manque de sensibilité par exemple, il va classer en faux positif un résultat qui est peut-être un vrai positif et sous-estimer la sensibilité du test évalué. Le degré de corrélation entre les erreurs du standard de référence et celles du test évalué va aussi soit amplifier soit diminuer les paramètres de validité du test qui est évalué (Rutjes 2007). Le western blot est décrit dans la littérature comme un test très spécifique mais pas plus sensible que le test ELISA (Johnson 2011) et a même été décrit dans une étude réalisée chez le cheval comme moins sensible que l'ELISA (Wagner *et al.* 2011). Certaines données issues de notre étude vont dans le même sens et argumentent en faveur d'une sensibilité moindre du test WB par rapport aux tests ELISA ou IF. En effet, parmi les 40 sérums > ou = à 1/512 en IF, on a observé 18 sérums négatifs en WB alors que ceux-ci étaient également positifs en ELISA. L'analyse détaillée des résultats et plus particulièrement l'interprétation détaillée des bandes de réaction WB positives présentes mais considérées non significatives selon l'algorithme en vigueur sur ces sérums permettrait peut-être de mieux comprendre ces résultats positifs en ELISA et IF mais classés négatifs en WB et leur répercussion sur la valeur prédictive positive des tests ELISA et IF calculée par comparaison au test WB.

L'analyse des paramètres de validité du test IF met une efficacité légèrement inférieure en évidence pour ce test par rapport au test ELISA. C'est lorsque l'IF est interprété au seuil 1/512 qu'on obtient pour ce test une efficacité comparable au test ELISA interprété au seuil douteux (respectivement 78,50 % et 79,49 %) avec une spécificité supérieure pour le test IF par rapport au test ELISA (respectivement 73,68% et 63,16 %) mais une sensibilité inférieure du test IF par rapport au test ELISA (respectivement 83,33 % et 95,83 %).

Les différents calculs de concordance permettent de considérer la concordance entre les tests sérologiques borrélioses IF et ELISA comme bonne (Kappa 0,70) voire très bonne (concordance positive corrigée 0,90) lorsque ceux-ci sont interprétés à la valeur seuil de positivité de 1/512 (IF) et « douteux » (ELISA). Ceci rejoint la concordance et la qualité jugée équivalente des tests IF et ELISA pour le diagnostic de la maladie de Lyme chez l'homme chez qui ces deux tests peuvent être utilisés indifféremment comme test de première ligne (CDC 2016).

Lorsque ces tests sont utilisés à des fins diagnostiques, et comparés au seuil WB positif pour le calcul des paramètres de validité, on a pu observer une sensibilité de 100% pour le test ELISA. En effet, tous les résultats positifs au test ELISA se sont avérés également positifs au test WB lorsque ce dernier est interprété au seuil positif qui est la valeur seuil qui oriente vers une infection à *Borrelia burgdorferi*. Une sensibilité de 90 % a été observée pour le test IF au seuil de 1/512 et de 70% au seuil de 1/1024. L'analyse des résultats a permis d'observer que cette sensibilité moindre semble liée à un défaut de fiabilité du test IF. La fluorescence observée est sujette à une interprétation subjective et la dilution qui correspond à l'extinction de la fluorescence est parfois difficile en raison de la fluorescence présente en « bruit de fond » présente, même à basse dilution. L'excellente sensibilité du test ELISA et la bonne sensibilité du test IF font de ces deux tests des tests de choix comme test de première ligne. Leur valeur prédictive négative très bonne permet en effet d'exclure un contact avec l'agent pathogène. La spécificité et la valeur prédictive positive de ces tests est cependant très insuffisante pour accepter, selon les principes d'une « evidence based veterinary medicine » que ces tests puissent être utilisés pour confirmer un diagnostic de maladie de Lyme chez les chevaux. En cas de résultat positif, un test de seconde ligne (WB) s'impose pour orienter vers une infection active. Les symptômes clinique, l'anamnèse, l'exposition potentielle à des morsures de tiques, devront faire partie intégrante du processus diagnostic ainsi que l'exclusion des autres pathologies éventuellement responsables des symptômes pour pouvoir raisonnablement orienter le diagnostic vers une maladie de Lyme. Cette recommandation de double test chez les chevaux n'est pas nouvelle (Buttler *et al.* 2005) et est également conseillée pour le diagnostic de la borréliose chez l'homme (Perronne 2014). Il n'est par contre pas conseillé de demander un test WB seul et de court-circuiter l'étape du test sérologique de première ligne car ceci va diminuer la spécificité du test WB (Johnson 2011). L'auteur décrit dans cet article comment une diminution de 1% de spécificité génèrerait sur base des chiffres américains de

2009 environ 34000 résultats faux positifs chez les patients, mettant ainsi en avant les conséquences importantes en termes de santé publique.

La simulation proposée pour illustrer les conséquences bénéfiques en termes de valeur prédictive positive d'une augmentation de la prévalence permet d'observer comment le choix des chevaux à tester va influencer la confiance que le vétérinaire pourra donner au résultat positif de son test sérologique. Une pratique rencontrée régulièrement en pratique consiste en effet, lorsque dans une écurie un cheval a été testé positif pour la borréliose, à tester l'ensemble des chevaux de l'écurie. Or le choix des chevaux testés aura des répercussions sur la valeur prédictive positive du résultat. Il est dans une optique de médecine vétérinaire factuelle, déconseillé de tester des chevaux non suspects de maladie de Lyme.

5. Forces et limites de l'étude

Une des forces de cette étude est d'avoir testé 100 sérums avec les 3 tests *Borrelia burgdorferi* utilisés en Belgique. Nous avons pris soin de sélectionner des sérums dont les taux en anticorps étaient répartis de façon homogène des taux les plus faibles aux taux les plus élevés. Il est également intéressant à noter que le nombre de sérums séropositifs en WB de notre échantillon (24 %) se rapproche sensiblement de la séroprévalence évaluée dans notre étude de séroprévalence (22 %). Ceci représente un atout pour notre étude comparative sachant à quel point il est difficile, dans les études de validation et d'évaluation de performance des tests, de construire un échantillon représentatif de la population étudiée (OIE 2013, Johnson 2011).

La limite principale de cette étude est liée au fait qu'en l'absence de « gold standard », les paramètres de validité ont été calculés par rapport au test WB utilisé comme standard de référence. Or d'une part, ce standard de référence n'est pas parfait et d'autre part, les tests ELISA et WB ne sont pas des indicateurs indépendants d'exposition à *Borrelia burgdorferi*. Il y a en effet, d'un point de vue méthodologique, des points communs entre les deux techniques. Les tests ELISA et WB sont construits à partir d'antigènes similaires (Johnson 2011) et c'est la procédure de séparation de ces antigènes qui diffère et permet d'être en WB plus spécifique qu'en ELISA par rapport au type et à la complexité de la réponse immunitaire.

Il ne faut pas perdre de vue non plus que seuls les paramètres de validité des tests IF et ELISA ont été étudiés et non les paramètres de précision (répétabilité et reproductibilité). Or ces paramètres de précision influencent également les résultats. Ceux du standard de référence sont eux aussi dépendants des paramètres de validité et de précision qui ne sont pas parfaits. La difficulté d'interprétation du test WB dont la positivité dépend du nombre, de la combinaison et de l'intensité des bandes, a par exemple donné lieu à des erreurs de classement que nous avons pu rectifier lors du contrôle qualité de nos résultats.

Analyse coût/bénéfice de différentes stratégies diagnostiques de prise en charge d'un cheval suspect de maladie de Lyme

1. Introduction

L'objectif de cette troisième partie du travail est d'évaluer les différentes stratégies de prise en charge des chevaux suspects de maladie de Lyme. A l'aide des données de séroprévalence *Borrelia burgdorferi* observées chez les chevaux vivant en Wallonie et des paramètres de validité diagnostique des tests sérologiques évalués respectivement dans la première et dans la deuxième partie de ce travail, nous évaluerons les coûts relatifs des différentes stratégies ainsi que la consommation en antibiotiques que nous exprimerons en terme d'antibiotiques « évitables » lorsque ceux-ci, au vu des données factuelles, ne sont pas justifiés. La conclusion de cette analyse n'est pas la décision mais devrait permettre aux praticiens d'envisager les conséquences de leurs choix en termes de coût pour le propriétaire du cheval et de responsabilité face à l'utilisation raisonnée des antibiotiques.

Le Conseil Supérieur de l'Ordre des Médecins Vétérinaires, conscient du rôle des vétérinaires dans la lutte contre l'antibiorésistance et remplissant ainsi pleinement sa mission de veiller à l'intérêt général, a explicitement défini la responsabilité du vétérinaire en prenant la décision d'ajouter fin 2014 un article à son Code de Déontologie :

***Art 33 bis** - Dans le cadre de la lutte contre l'antibiorésistance, le vétérinaire utilise les antimicrobiens après diagnostic, avec discernement, et exclusivement pour des traitements justifiés scientifiquement et médicalement. Il donne, lors de leur fourniture ou prescription, des conseils sur leur bon usage au responsable/propriétaire des animaux. Il veille tout particulièrement à respecter les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) formulées à propos de l'usage d'antimicrobiens revêtant une importance critique à la fois pour la santé humaine et animale (voir annexe 6).*

Cette partie du travail constitue une initiative qui vise à promouvoir l'utilisation raisonnée des antibiotiques en médecine vétérinaire et plus particulièrement dans le cadre du traitement des chevaux suspects de maladie de Lyme.

Selon le rapport Belvetsac 2014 la consommation totale de produits antimicrobiens en médecine vétérinaire exprimée en tonnes de substance active a augmenté en Belgique de 3,2 % en 2014. Un chiffre décevant après deux années consécutives de diminution substantielle (Belvetsac, 2014). Il est à noter que ces chiffres comprennent tant les produits antimicrobiens utilisés en traitement que les pré-mélanges et représentent des chiffres issus pour toutes les espèces animales confondues. Aucune donnée n'est en effet disponible sur la proportion d'antimicrobiens utilisés par espèce parce que les chiffres sont établis sur base des ventes des produits antimicrobiens vétérinaires et sur base des chiffres de production animale. Ces données ayant augmenté au cours des dernières années,

l'accroissement de la consommation en antibiotiques vétérinaires ajustée sur la quantité de biomasse produite est de 1,1 % pour l'année 2014 par rapport à 2013. Les tetracyclines utilisées dans le traitement de la maladie de Lyme font partie des trois classes d'antimicrobiens les plus employés en médecine vétérinaire avec une consommation de 61,9 tonnes en 2014 (Belvetsac 2014).

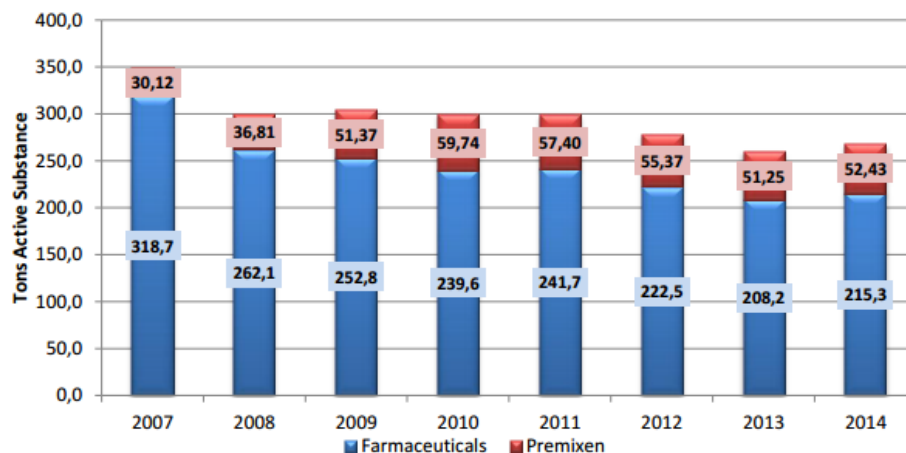


Figure 11 . Evolution de la consommation nationale totale d'antimicrobiens à usage vétérinaire en Belgique pour les années 2007-2014 (exprimée en tonnes de substance active)(source: BelVetSac 2014)

Pour expliquer cette augmentation de la consommation d'antibiotiques à usage vétérinaire enregistrée en 2014, les auteurs de ce rapport incriminent une « *diminution de l'attention accordée à l'utilisation responsable et restrictive d'antimicrobiens* » et recommandent de faire des efforts en matière d'information et de sensibilisation afin de réduire l'utilisation d'antimicrobiens.

La troisième partie de ce travail dont l'objectif est d'aider les vétérinaires dans leur choix de prise en charge de la stratégie diagnostique lorsqu'ils sont confrontés à un cheval suspect de maladie de Lyme s'inscrit dans cette perspective.

2. Matériel et méthode :

Les différentes étapes pour cette partie analyse coût/efficacité ont été :

- ✱ d'identifier les différentes stratégies actuellement mises en place par les vétérinaires face à un cheval suspect de maladie de Lyme
- ✱ de rassembler:
 - les données relatives à la séroprévalence *Borrelia burgdorferi* chez les chevaux en Wallonie
 - les données relatives aux paramètres de validité diagnostique des tests sérologiques utilisés en routine comme aide au diagnostic chez les chevaux suspects de borréliose.
- ✱ de chiffrer le poids des différentes stratégies en termes de coût monétaire à charge du propriétaire et en termes d'antibiotiques consommés et « évitables ».

Les différentes stratégies ont été identifiées de façon informelle et correspondent aux stratégies largement répandues sur le terrain (table 7)

Table 7 : présentation des différentes stratégies de prise en charge d'un cheval suspect de maladie de Lyme retenues pour l'analyse coût/bénéfice

Stratégies	
Stratégie 1	tester les chevaux suspects et traitement AB si titre \geq à 1/128
Stratégie 2	tester les chevaux suspects et traitement AB si titre \geq à 1/512
Stratégie 3	tester les chevaux suspects et traitement AB si titre \geq à 1/1024
Stratégie 4	tester les chevaux suspects et traitement AB si titre \geq à 1/512 confirmé par WB

En ce qui concerne le traitement antibiotique (AB) des chevaux suspects de maladie de Lyme, le protocole pris en compte est celui du traitement à la doxycycline. Son utilisation, même si elle semble moins efficace que le traitement en intraveineux avec l'oxytetracycline ou le ceftiofur (Chang *et al.* 2005) est en effet largement répandue sur le terrain car elle présente l'avantage de pouvoir être administrée par voie orale. Le traitement à base d'oxytetracycline est plus coûteux (127,33 euros/cheval comparé à 32,82 euros/cheval pour le traitement à base de doxycycline aux doses recommandées), en raison du prix plus élevé du médicament et parce qu'il conviendra d'ajouter le coût qui sera plus élevé en honoraires vétérinaires pour un traitement intraveineux plutôt que par voie orale (passage répété du vétérinaire ou de la surveillance clinique du cheval en cas d'hospitalisation).

Les coûts des antibiotiques et des analyses sont ceux en vigueur en Belgique chez un fournisseur de médicaments vétérinaires et dans un laboratoire offrant la possibilité de faire les différents tests sérologiques (IF, ELISA et WB). L'analyse a été réalisée en considérant l'IF comme test sérologique de première ligne en raison des chiffres de prévalence qu'il était possible de calculer sur base de l'analyse rétrospective de 1259 sérologies borrélioses réalisées par IF entre 2012 et 2014 chez des chevaux belges suspects de maladie de Lyme (annexe 1). Le prix du test ELISA est identique au test IF. Ceux-ci peuvent, comme nous l'avons mis en évidence dans notre étude comparative, être tous les deux utilisés comme tests de première ligne. Les données retenues pour l'analyse coût/bénéfice sont reprises dans la table 8.

Table 8 : données relatives au % de chevaux séropositifs *Borrelia burgdorferi* observés chez les chevaux suspects de maladie de Lyme en Wallonie aux paramètres de validité diagnostiques du test IF calculé par rapport au test WB utilisé comme standard de référence ainsi qu'au coût du traitement et des tests sérologiques

Données	
% de résultats positifs au titre \geq 1/128 chez les chevaux suspects	0,80
% de résultats positifs au titre \geq 1/512 chez les chevaux suspects	0,33
% de résultats positifs au titre \geq 1/1024 chez les chevaux suspects	0,14
Spécificité du test IF au seuil 1/128	0,21
Sensibilité du test IF au seuil 1/128	0,90
Spécificité du test IF au seuil 1/512	0,65
Sensibilité du test IF au seuil 1/512	0,90
Spécificité du test IF au seuil 1/1024	0,86
Sensibilité du test au seuil 1/1024	0,70
Coût AB thérapie/CV (doxycycline 10 mg/kg 2X/J pendant 3 semaines)	32,82
Quantité d'AB/CV (exprimé en g de substance active de doxycycline)	210
Coût d'une consultation (exprimé en euros)	50
Prix du test IF (exprimé en euros)	35,84
Prix du test WB (exprimé en euros)	35,84

3. Résultats

Arbre décisionnel

En annexe (4) est illustré l'arbre décisionnel qui a permis d'analyser les 4 stratégies proposées. Les résultats sont repris dans la table 10 en termes de coût à charge du propriétaire, de consommation en antibiotiques évaluée pour 100 chevaux suspects et d'antibiotiques non justifiés ou « évitables » pour chaque stratégie. Ces coûts tiennent compte du prix du traitement antibiotique (AB) à base de doxycycline et du prix des tests sérologiques et du prix des honoraires vétérinaires (table 9) :

Table 9 : résultats de l'analyse des différentes stratégies de prise en charge des chevaux suspects de maladie de Lyme en Wallonie (coût pour le propriétaire, antibiotiques administrés et « évitables »)

	Coût/CV	AB/100 CV (kg)	AB « évitables »/100CV (kg)	% d'AB non justifiés
1	112,10	28,39	13,27	47%
2	96,67	8,66	2,43	28%
3	90,43	2,47	0,41	17%
4	107,41	6,24	/	0%

4. Discussion

Nous avons identifié et analysé les conséquences de 4 stratégies de prise en charge des chevaux suspects de maladie de Lyme et pondéré le poids de chacune de ces 4 stratégies à l'aide des données issues de la première et deuxième partie du mémoire en prenant également en compte les données de prévalence observées suite à l'analyse de 1259 sérologies borréliose réalisées chez des chevaux suspects de borréliose en Belgique (annexe 1).

Le seuil de 1/64 est le seuil de positivité annoncé par le producteur du kit IF. Malgré le commentaire mis en place par le laboratoire sur les protocoles de réponse qui précise que les résultats 1/64, 1/128 et 1/256 sont peu significatifs, que les résultats doivent être évalués en parallèle avec la clinique et l'historique d'exposition aux tiques et qu'il est conseillé de contrôler les résultats de sérologie positifs par un sérum couplé ou un WB, cette pratique est malheureusement encore trop rarement appliquée sur le terrain. Une approche largement répandue, mais peu justifiable scientifiquement, consiste en effet, vu l'absence de signes cliniques spécifiques chez les chevaux suspects de maladie de Lyme, à réaliser un test sérologique et à mettre en place une antibiothérapie si le résultat de cette sérologie est \geq à 1/128. Au vu des résultats de l'analyse coût/bénéfice on peut constater que cette stratégie n'est pas seulement la stratégie la plus couteuse, mais aussi la stratégie qui, en raison de la spécificité basse du test sérologique IF lorsque celui-ci est interprété au seuil de positivité de 1/128, génère une consommation importante d'antibiotiques non justifiés. En effet, 47% des antibiotiques administrés aux chevaux représentent dans cette stratégie des antibiotiques non justifiés liés à un diagnostic erroné.

L'efficacité du test IF lorsque celui-ci est utilisé à des fins diagnostiques a été calculée dans l'étude comparative en utilisant le test WB au seuil positif comme standard de référence. Elle est identique (78 %) pour les seuils de 1/512 et 1/1024. Le seuil de 1/512 offre cependant une meilleure sensibilité (90 %) que celle au seuil 1/1024 (70 %), au détriment par contre de la spécificité qui est de 65 % au seuil de 1/512 contre 86 % au seuil de 1/1024 entraînant la réduction de consommation d'antibiotiques. La sensibilité et la spécificité devront toutes les deux être évaluées en fonction du risque lié aux résultats faux négatifs ou faux positifs. Dans le cas présent, le risque lié aux faux négatifs et donc à une perte de sensibilité peut entraîner que des chevaux atteints de maladie de Lyme ne soient pas traités. Le danger lié aux faux positifs est que des chevaux non atteints de maladie de Lyme soient inutilement mis sous antibiotiques avec les risques que cela comporte tant au niveau individuel qu'au niveau de la santé publique. Force est de constater que la quantité d'antibiotiques non justifiés administrés aux chevaux pour ces deux stratégies représente encore 28 % (seuil \geq à 1/512) et 17 % (seuil \geq à 1/1024). Le taux de faux négatifs de la stratégie 1/1024 est par contre de 3 % contre 1 % lorsque le seuil utilisé est celui de 1/512. Le risque lorsque seuls les titres \geq à 1/1024 sont considérés comme positif est

donc de ne pas détecter certains chevaux atteints de borréliose avec les conséquences que cela comporte pour le cheval malade.

Dans la quatrième stratégie les chevaux suspects qui ont un titre \geq à 1/512 sont soumis à un test WB. Elle permet de maintenir une bonne sensibilité tout en augmentant largement la spécificité et se révèle plus intéressante d'un point de vue financier pour le propriétaire que la première stratégie (mettre sous antibiotiques au seuil de \geq à 1/128). La 4^{ème} stratégie comporte un risque financier supérieur pour le propriétaire par rapport aux stratégies consistant à traiter à la doxycycline des chevaux avec sérologie de 1/512 ou 1/1024 sans contrôle WB. Mais elle a l'avantage d'éviter l'administration d'antibiotiques non justifiés.

Les résultats observés à l'issue de cette analyse coût/bénéfice plaident en faveur de la stratégie en deux étapes qui consiste à réaliser un test sérologique et de contrôler, en cas de résultat positif, celui-ci par une analyse de type WB. Cette manière de faire rejoint les recommandations que l'on retrouve en médecine humaine (CDC 2016) et celles déjà proposées par Butler *et al.* en 2005. Ces conseils ne sont cependant que trop rarement mis en pratique sur le terrain.

Cette analyse a permis d'illustrer, à l'aide de données concrètes, les conséquences du choix de prise en charge des chevaux suspects de Lyme. Le choix de la stratégie diagnostique revient aux praticiens. Il constitue une opportunité que les vétérinaires ont, en appliquant les principes de médecine factuelle, de prendre leur responsabilité dans la lutte contre l'antibiorésistance en veillant à n'administrer des antibiotiques chez les chevaux suspects de borréliose, que lorsque ceux-ci sont justifiés.

5. Limites et forces de l'étude

Un point fort de cette analyse coût/bénéfice réside dans le fait qu'elle s'appuie sur des données de prévalence rencontrées sur le terrain et valables en Belgique. Elles ont été calculées sur un échantillon de 1259 sérums de chevaux suspects de maladie de Lyme soumis pour analyse sérologique. Une limite de ce travail est que les stratégies ont été identifiées de façon informelle. Une enquête réalisée auprès des vétérinaires belges aurait permis de justifier, voire de diversifier les stratégies mises en place par ceux-ci sur le terrain lorsqu'ils sont confrontés à un cheval suspect de borréliose. Cette perspective d'avenir aurait le mérite de réaliser l'analyse coût/bénéfice en s'appuyant sur des stratégies plus représentatives des pratiques habituelles. L'évaluation d'un seul traitement à base de doxycycline est une autre limite de cette étude. Une analyse étendue aux autres protocoles aurait permis d'évaluer les répercussions des autres traitements utilisés en routine tant au niveau du prix et des honoraires vétérinaires que des conséquences en termes de risque de santé publique. Un traitement à base de fluoroquinolones a des répercussions encore plus néfastes en terme d'antibiorésistance (Van Doorslaer *et al.* 2014).

Conclusions

La maladie de Lyme est une zoonose complexe qui suscite une attention croissante en santé publique. Les données épidémiologiques nécessaires pour la surveillance et la prévention de cette pathologie doivent prendre en compte non seulement l'agent pathogène, mais également le vecteur, les hôtes potentiels et les relations que ceux-ci entretiennent entre eux et avec leur environnement. Dans ce contexte, c'est une approche « one health » qui s'avère la plus justifiée. De nombreuses controverses existent que ce soit par rapport aux données épidémiologiques, au diagnostic ou au traitement de la maladie de Lyme tant chez l'homme que chez le cheval. Les tests sérologiques font, en raison du peu de symptômes spécifiques décrits chez le cheval, partie intégrante du processus diagnostique. L'interprétation des résultats doit cependant se faire en tenant compte des données épidémiologiques de séroprévalence et de la valeur diagnostique des tests sérologiques. Les antibiotiques largement utilisés dans le traitement des chevaux suspects de borréliose soulèvent en effet la question de la responsabilité des vétérinaires dans la lutte contre l'antibiorésistance et rappellent leur implication en matière de santé publique.

Une séroprévalence de 22% a été observée dans notre échantillon composé de 303 sérums prélevés entre avril 2014 et avril 2016 chez des chevaux vivant en Wallonie qui n'avaient pas présenté de signes suspects de maladie de Lyme durant les 12 derniers mois. Ce taux se rapproche du taux observé ces dix dernières années dans plusieurs autres pays européens et reflète un portage latent présent dans l'espèce équine. Elle doit inciter à la prudence lors de l'interprétation d'un résultat de sérologie positif réalisé dans le cadre d'une suspicion de borréliose. En effet, peu de cas documentés de maladie de Lyme ont été rapportés chez le cheval. Aucune association significative n'a pu être mise en évidence entre la séroprévalence et la province dans laquelle résidaient les chevaux ni par rapport au mois ou à l'année de prélèvement. Une association significative (p -valeur= 0,02) a été mise en évidence entre la séroprévalence et l'âge du cheval et ceci sera donc également une donnée dont il faudra tenir compte lors de l'interprétation d'une sérologie positive.

L'évaluation de la valeur diagnostique des tests sérologiques IF et ELISA réalisée dans la deuxième partie de ce travail a permis d'illustrer l'influence des différentes valeurs de seuil utilisés et de la population visée, plus particulièrement la probabilité prétest des chevaux qui seront testés, sur les paramètres de validité des tests. La sensibilité bonne voire très bonne des tests sérologiques IF et ELISA *Borrelia burgdorferi* permet d'assurer une bonne valeur prédictive négative (de 95 % à 100% selon les tests et les seuils utilisés) et donc d'exclure une borréliose en cas de résultat négatif. Leur spécificité est cependant trop faible et se manifeste par des valeurs prédictives positives qui varient de 11 à 33% de sorte qu'un résultat positif à lui seul est insuffisant pour argumenter un diagnostic de borréliose, même chez un cheval qui présente des symptômes suspects de la maladie. Un test de

seconde ligne de type western blot plus spécifique est indispensable et devrait faire partie intégrante du processus diagnostique. Dans le cas contraire le risque existe en effet d'administrer un traitement antibiotique non justifié avec les conséquences néfastes que cela comporte tant pour le cheval que pour le développement de l'antibiorésistance. Cette stratégie diagnostique en deux étapes est également celle recommandée chez l'homme.

L'évaluation coût/bénéfice réalisée dans la troisième partie du travail tient compte des données épidémiologiques observées chez les chevaux en Wallonie et des paramètres de validité des tests sérologiques. Elle est proposée comme base de réflexion pour aider les vétérinaires praticiens dans le choix de la stratégie diagnostique la plus appropriée face à un cheval suspect de maladie de Lyme. Cette analyse a permis d'illustrer les conséquences de ce choix en termes de consommation d'antibiotiques qui selon notre modèle basé sur un protocole de traitement per os à base de doxycycline peut aller jusqu'à 47% d'antibiotiques « évitables » lorsque les tests sérologiques sont utilisés et interprétés de façon appropriée.

Au terme de ce travail il nous est donc possible d'argumenter la nécessité de prendre en charge les chevaux suspects de maladie de Lyme en tenant compte des données épidémiologiques de séroprévalence et de la valeur diagnostique des tests sérologiques. La valeur diagnostique observée permet de conclure que les tests IF et ELISA sont bien adaptés comme tests de première ligne pour exclure un diagnostic de borréliose mais les résultats positifs devront nécessairement faire l'objet d'une confirmation par un test de seconde ligne plus spécifique. C'est en s'appuyant sur des données factuelles que nous pourrions aider les vétérinaires à remplir leur responsabilité en termes d'utilisation raisonnée des antibiotiques.

Bibliographie

Amory, H, Houben, R, Pitel, PH, Meersschaert, C 2014, 'Borréliose: mythe ou réalité', *Proceedings of the Belgian Equine Practitioners Society*, 15 novembre 2014, pp.24-40.

Aguero-Rosenfeld, ME & Wormser, GP 2015, 'Lyme disease: diagnostic issues and controversies', *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol. 15, no. 1, pp. 1–4.

Belvetsac 2014,' Belgian Veterinary Surveillance of Antimicrobial Consumption National Consumption Report', consulté le 20 février 2016 sur <<http://www.amcra.be/fr/belvet-sac-rapport-2014>>

Berende, A, ter Hofstede, HJM, Vos, FJ, van Middendorp, H, Vogelaar, ML, Tromp, M, van den Hoogen, FH, Donders, ART, Evers, AWM & Kullberg, BJ 2016, 'Randomized Trial of Longer-Term Therapy for Symptoms Attributed to Lyme Disease', *New England Journal of Medicine*, vol. 374, no. 13, pp. 1209–1220.

Bleyenheuft, C, Lernout, T, Berger, N, Rebolledo, J, Leroy, M, Robert, A & Quoilin, S 2015, 'Epidemiological situation of Lyme borreliosis in Belgium, 2003 to 2012', *Archives of Public Health = Archives Belges De Santé Publique*, vol. 73, no. 1, p. 33.

Borchers, AT, Keen, CL, Huntley, AC & Gershwin, ME 2015, 'Lyme disease: a rigorous review of diagnostic criteria and treatment', *Journal of Autoimmunity*, vol. 57, pp. 82–115.

Bouquet, J, Soloski, MJ, Swei, A, Cheadle, C, Federman, S, Billaud, J-N, Rebman, AW, Kabre, B, Halpert, R, Boorgula, M, Aucott, JN & Chiu, CY 2016, 'Longitudinal Transcriptome Analysis Reveals a Sustained Differential Gene Expression Signature in Patients Treated for Acute Lyme Disease', *mBio*, vol. 7, no. 1, pp. e00100–00116.

Braks, M, Medlock, JM, Hubalek, Z, Hjertqvist, M, Perrin, Y, Lancelot, R, Duchyene, E, Hendrickx, G, Stroo, A, Heyman, P & Sprong, H 2014, 'Vector-Borne Disease Intelligence: Strategies to Deal with Disease Burden and Threats', *Frontiers in Public Health*, vol. 2, viewed 28 May 2016, <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpubh.2014.00280/abstract>>.

Bryan, HM, Darimont, CT, Paquet, PC, Ellis, JA, Goji, N, Gouix, M & Smits, JE 2011, 'Exposure to infectious agents in dogs in remote coastal British Columbia: Possible sentinels of diseases in wildlife and humans', *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Vétérinaire*, vol. 75, no. 1, pp. 11–17.

Burbelo, PD, Bren, KE, Ching, KH, Coleman, A, Yang, X, Kariu, T, Iadarola, MJ & Pal, U 2011, 'Antibody profiling of *Borrelia burgdorferi* infection in horses', *Clinical and vaccine immunology: CVI*, vol. 18, no. 9, pp. 1562–1567.

Burgess, EC & Mattison, M 1987, 'Encephalitis associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a horse', *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 191, no. 11, pp. 1457–1458.

Butler, CM, Houwers, DJ, Jongejan, F & van der Kolk, JH 2005, '*Borrelia burgdorferi* infections with special reference to horses. A review', *The Veterinary Quarterly*, vol. 27, no. 4, pp. 146–156.

Center of Disease Control and Prevention , consulté le 15 avril 2016
<<http://www.cdc.gov/lyme/diagnostictesting/LabTest/OtherLab/index.html>>

Chang, Y-F, Ku, Y-W, Chang, C-F, Chang, C-D, McDonough, SP, Divers, T, Pough, M & Torres, A 2005, 'Antibiotic treatment of experimentally *Borrelia burgdorferi*-infected ponies', *Veterinary Microbiology*, vol. 107, no. 3-4, pp. 285–294.

Chantziaras, I, Boyen, F, Callens, B & Dewulf, J 2014, 'Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries', *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 69, no. 3, pp. 827–834.

Claerebout, E, Losson, B, Cochez, C, Casaert, S, Dalemans, A-C, De Cat, A, Madder, M, Saegerman, C, Heyman, P & Lempereur, L 2013, 'Ticks and associated pathogens collected from dogs and cats in Belgium', *Parasites & Vectors*, vol. 6, p. 183.

Confédération Belge du Cheval, consulté le 15 janvier 2016< <http://www.cbc-bcp.be/fr/>>

Cook, MJ 2015, 'Lyme borreliosis: a review of data on transmission time after tick attachment', *International Journal of General Medicine*, vol. 8, pp. 1–8.

De Wilde, M, Speeckaert, M, Callens, R & Van Biesen, W 2016, 'Ceftriaxone-induced immune hemolytic anemia as a life-threatening complication of antibiotic treatment of "chronic Lyme disease"', *Acta Clinica Belgica*, pp. 1–5.

Divers, TJ, Grice, AL, Mohammed, HO, Glaser, AL & Wagner, B 2012, 'Changes in *Borrelia burgdorferi* ELISA antibody over time in both antibiotic treated and untreated horses', *Acta Veterinaria Hungarica*, vol. 60, no. 4, pp. 421–429.

Dzierzecka, M & Kita, J 2002, 'The use of chosen serological diagnostic methods in Lyme disease in horses. Part I. Indirect immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)', *Polish Journal of Veterinary Sciences*, vol. 5, no. 2, pp. 71–77.

Ebani, VV, Bertelloni, F, Pinzauti, P & Cerri, D 2012, 'Seroprevalence of *Leptospira* spp. and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Italian horses', *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM*, vol. 19, no. 2, pp. 237–240.

Egenvall, A, Franzén, P, Gunnarsson, A, Engvall, EO, Vågsholm, I, Wikström, UB & Artursson, K 2001, 'Cross-sectional study of the seroprevalence to *Borrelia burgdorferi* sensu lato and granulocytic *Ehrlichia* spp. and demographic, clinical and tick-exposure factors in Swedish horses', *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 49, no. 3-4, pp. 191–208.

European Center of Disease Prevention and Control, consulté le 10 mai 2016
<<http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/vector-maps/Pages/VBORNET-maps-tick-species.aspx>>

European Concerted Action on Lyme borreliosis, consulté le 31 mars 2016<<http://www.eucalb.com>>

Gassner, F, Takken, W, Plas, CL der, Kastelein, P, Hoetmer, AJ, Holdinga, M & van Overbeek, LS 2013, 'Rodent species as natural reservoirs of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in different habitats of *Ixodes ricinus* in The Netherlands', *Ticks and Tick-Borne Diseases*, vol. 4, no. 5, pp. 452–458.

Goossens, HA, van den Bogaard, AE & Nohlmans, MK 1999, 'Evaluation of fifteen commercially available serological tests for diagnosis of Lyme borreliosis', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, vol. 18, no. 8, pp. 551–560.

Goossens, HA, van den Bogaard, AE & Nohlmans, MK 2001, 'Dogs as sentinels for human Lyme borreliosis in The Netherlands', *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 39, no. 3, pp. 844–848.

Grave, K, Greko, C, Kvaale, MK, Torren-Edo, J, Mackay, D, Muller, A, Moulin, G & ESVAC Group 2012, 'Sales of veterinary antibacterial agents in nine European countries during 2005-09: trends and patterns', *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 67, no. 12, pp. 3001–3008.

- Greene, CE, Straubinger, RK, Levy, S 2012, 'Borreliosis', in *Infectious diseases of the dog and cat*, Elsevier Inc, pp. 447-465.
- Guellec, D, Narbonne, V, Cornec, D, Marhadour, T, Varache, S, Dougados, M, Daurès, JP, Jousse-Joulin, S, Devauchelle-Pensec, V & Saraux, A 2016, 'Diagnostic impact of routine Lyme serology in recent-onset arthritis: results from the ESPOIR cohort', *RMD Open*, vol. 2, no. 1, p. e000120.
- Hansen, MGB, Christoffersen, M, Thuesen, LR, Petersen, MR & Bojesen, AM 2010, 'Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in Danish horses', *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 52, p. 3.
- Heylen, DJA, Müller, W, Vermeulen, A, Sprong, H & Matthysen, E 2015, 'Virulence of recurrent infestations with *Borrelia*-infected ticks in a *Borrelia*-amplifying bird', *Scientific Reports*, vol. 5, p. 16150.
- Hjetland, R, Nilsen, RM, Grude, N & Ulvestad, E 2014, 'Seroprevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* sensu lato in healthy adults from western Norway: risk factors and methodological aspects', *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, vol. 122, no. 11, pp. 1114–1124.
- Hofhuis, A, Harms, M, van den Wijngaard, C, Sprong, H & van Pelt, W 2015, 'Continuing increase of tick bites and Lyme disease between 1994 and 2009', *Ticks and Tick-Borne Diseases*, vol. 6, no. 1, pp. 69–74.
- Imai, DM, Barr, BC, Daft, B, Bertone, JJ, Feng, S, Hodzic, E, Johnston, JM, Olsen, KJ & Barthold, SW 2011, 'Lyme Neuroborreliosis in 2 Horses', *Veterinary Pathology*, vol. 48, no. 6, pp. 1151–1157.
- James, FM, Engiles, JB & Beech, J 2010, 'Meningitis, cranial neuritis, and radiculoneuritis associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a horse', *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 237, no. 10, pp. 1180–1185.
- Johnson, AL, Divers, TJ & Chang, Y-F 2008, 'Validation of an in-clinic enzyme-linked immunosorbent assay kit for diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infection in horses', *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, vol. 20, no. 3, pp. 321–324.
- Johnson, BJB 2011, 'Laboratory diagnostic testing for *Borrelia burgdorferi* infection', in *Lyme disease: an evidence-based approach*, CAB International, pp. 73-88.
- Kesteman, T, Rossi, C, Bastien, P, Brouillard, J, Avesani, V, Olive, N, Martin, P & Delmée, M 2010a, 'Prevalence and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Ixodes ticks in Belgium', *Acta Clinica Belgica*, vol. 65, no. 5, pp. 319–322.
- Kiss, T, Cadar, D, Krupaci, AF, Bordeanu, A, Brudaşcă, GF, Mihalca, AD, Mircean, V, Gliga, L, Dumitrache, MO & Spînu, M 2011, 'Serological reactivity to *Borrelia burgdorferi* sensu lato in dogs and horses from distinct areas in Romania', *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, vol. 11, no. 9, pp. 1259–1262.
- Lambin, EF, Tran, A, Vanwambeke, SO, Linard, C & Soti, V 2010, 'Pathogenic landscapes: interactions between land, people, disease vectors, and their animal hosts', *International Journal of Health Geographics*, vol. 9, p. 54.
- Lappin, MR, Chandrashekar, R, Stillman, B, Liu, J & Mather, TN 2015, 'Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* infection in cats after exposure to wild-caught adult *Ixodes scapularis*', *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, vol. 27, no. 4, pp. 522–525.

- Laus, F, Veronesi, F, Passamonti, F, Paggi, E, Cerquetella, M, Hyatt, D, Tesei, B & Fioretti, DP 2013, 'Prevalence of Tick Borne Pathogens in Horses from Italy', *Journal of Veterinary Medical Science*, vol. 75, no. 6, pp. 715–720.
- Leeftang, MMG, Ang, CW, Berkhout, J, Bijlmer, HA, Van Bortel, W, Brandenburg, AH, Van Burgel, ND, Van Dam, AP, Dessau, RB, Fingerle, V, Hovius, JWR, Jaulhac, B, Meijer, B, Van Pelt, W, Schellekens, JFP, Spijker, R, Stelma, FF, Stanek, G, Verduyn-Lunel, F, Zeller, H & Sprong, H 2016, 'The diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis in Europe: a systematic review and meta-analysis', *BMC Infectious Diseases*, vol. 16, no. 1, viewed 28 May 2016, <<http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-016-1468-4>>.
- Lempereur, L 2012, 'Epidémiologie of babesiosis : their vectors and vertebrate hosts with emphasis on potential zoonotic species' *Thesis presented at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege*, pp.67.
- Linard, C, Lamarque, P, Heyman, P, Ducoffre, G, Luyasu, V, Tersago, K, Vanwambeke, SO & Lambin, EF 2007, 'Determinants of the geographic distribution of Puumala virus and Lyme borreliosis infections in Belgium', *International Journal of Health Geographics*, vol. 6, no. 1, p. 15.
- Little, SE, Heise, SR, Blagburn, BL, Callister, SM & Mead, PS 2010, 'Lyme borreliosis in dogs and humans in the USA', *Trends in Parasitology*, vol. 26, no. 4, pp. 213–218.
- Lohr, B, Müller, I, Mai, M, Norris, DE, Schöffski, O & Hunfeld, K-P 2015, 'Epidemiology and cost of hospital care for Lyme borreliosis in Germany: lessons from a health care utilization database analysis', *Ticks and Tick-Borne Diseases*, vol. 6, no. 1, pp. 56–62.
- Lou, Y, Wu, J & Wu, X 2014, 'Impact of biodiversity and seasonality on Lyme-pathogen transmission', *Theoretical Biology & Medical Modelling*, vol. 11, p. 50.
- Marques, AR 2015, 'Laboratory diagnosis of Lyme disease: advances and challenges', *Infectious Disease Clinics of North America*, vol. 29, no. 2, pp. 295–307.
- Maurizi, L, Marié, J-L, Aoun, O, Courtin, C, Gorsane, S, Chal, D & Davoust, B 2010, 'Seroprevalence survey of equine Lyme borreliosis in France and in sub-Saharan Africa', *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, vol. 10, no. 5, pp. 535–537.
- Mc Ewen, SA 2012, 'Evaluation quantitative des risques pour la santé publique associés à l'utilisation des agents antimicrobiens chez les animaux et à la sélection de la résistance : examen des rapports publiés', *Revue scientifique et technique de l'OIE*, vol. 31, no.1, pp.261-276.
- Medlock, JM, Hansford, KM, Bormane, A, Derdakova, M, Estrada-Peña, A, George, J-C, Golovljova, I, Jaenson, TG, Jensen, J-K, Jensen, PM, Kazimirova, M, Oteo, JA, Papa, A, Pfister, K, Plantard, O, Randolph, SE, Rizzoli, A, Santos-Silva, MM, Sprong, H, Vial, L, Hendrickx, G, Zeller, H & Van Bortel, W 2013, 'Driving forces for changes in geographical distribution of Ixodes ricinus ticks in Europe', *Parasites & Vectors*, vol. 6, no. 1, p. 1.
- Moyaert, H, Decostere, A, De Wilde, H, Liebisch, G, Maes, D, Deprez, P, Haesebrouck, F 2006, 'Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in horses in Flanders', *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, vol. 75, no.75, pp.436-438.
- Obsomer, V, Boucher, I & Delmée, M 2013, 'Dutch borders impervious to ticks or Lyme borreliosis underreporting in Belgium', *Acta Clinica Belgica*, vol. 68, no. 5, p. 390.
- Obsomer, V, Wirtgen, M, Linden, A, Claerebout, E, Heyman, P, Heylen, D, Madder, M, Maris, J, Lebrun, M, Tack, W, Lempereur, L, Hance, T & Van Impe, G 2013, 'Spatial disaggregation of tick

occurrence and ecology at a local scale as a preliminary step for spatial surveillance of tick-borne diseases: general framework and health implications in Belgium', *Parasites & Vectors*, vol. 6, p. 190.

Office International des Epizooties, consulté le 25 avril 2016< <http://oie.int/fr/pour-les-medias/editoriaux/detail/article/risks-associated-with-the-use-of-antimicrobials-in-animals-worldwide/>>

OIE, 'Principles and Methods of Validation of Diagnostic Assays for Infectious Diseases' adopted by the World Assembly of Delegates on May 2013, consulté le 15 janvier 2016, <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.05_VALIDATION.pdf .>

Overlegorganen gezondheid België, 'Lyme borreliose', consulté le 15 mei 2015 <http://overlegorganen.gezondheid.belgie.be/sites/default/files/documents/lyme_borreliose_finaal_nl_0.pdf>

Ozdenerol, E 2015, 'GIS and Remote Sensing Use in the Exploration of Lyme Disease Epidemiology', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 12, no. 12, pp. 15182–15203.

Pantchev, N, Pluta, S, Huisinga, E, Nather, S, Scheufelen, M, Vrhovec, MG, Schweinitz, A, Hampel, H & Straubinger, RK 2015, 'Tick-borne Diseases (Borreliosis, Anaplasmosis, Babesiosis) in German and Austrian Dogs: Status quo and Review of Distribution, Transmission, Clinical Findings, Diagnostics and Prophylaxis', *Parasitology Research*, vol. 114, no. S1, pp. 19–54.

Passamonti, F, Veronesi, F, Cappelli, K, Capomaccio, S, Reginato, A, Miglio, A, Vardi, DM, Stefanetti, V, Coletti, M, Bazzica, C & Pepe, M 2015, 'Polysynovitis in a horse due to *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection--Case study', *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM*, vol. 22, no. 2, pp. 247–250.

Pérez, D, Kneubühler, Y, Rais, O & Gern, L 2012, 'Seasonality of *Ixodes ricinus* Ticks on Vegetation and on Rodents and *Borrelia burgdorferi* sensu lato Genospecies Diversity in Two Lyme Borreliosis-Endemic Areas in Switzerland', *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, vol. 12, no. 8, pp. 633–644.

Perronne, C 2014, 'Lyme and associated tick-borne diseases: global challenges in the context of a public health threat', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 4, viewed 2 January 2016, <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00074/abstract>>.

Pichon, B, Mousson, L, Figureau, C, Rodhain, F & Perez-Eid, C 1999, 'Density of deer in relation to the prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in *Ixodes ricinus* nymphs in Rambouillet forest, France', *Experimental & Applied Acarology*, vol. 23, no. 3, pp. 267–275.

Powers, DMW 2014, 'The Problem with Kappa', *Proceedings of the 13th Conference of the European Chapter of the Association for Computational Linguistics*, pp.345-355.

Priest, HL, Irby, NL, Schlafer, DH, Divers, TJ, Wagner, B, Glaser, AL, Chang, Y-F & Smith, MC 2012, 'Diagnosis of *Borrelia*-associated uveitis in two horses: DIAGNOSIS OF BORRELIA-ASSOCIATED UVEITIS', *Veterinary Ophthalmology*, vol. 15, no. 6, pp. 398–405.

Pritt, BS, Mead, PS, Johnson, DKH, Neitzel, DF, Respicio-Kingry, LB, Davis, JP, Schiffman, E, Sloan, LM, Schriefer, ME, Replogle, AJ, Paskewitz, SM, Ray, JA, Bjork, J, Steward, CR, Deedon, A, Lee, X, Kingry, LC, Miller, TK, Feist, MA, Theel, ES, Patel, R, Irish, CL & Petersen, JM 2016, 'Identification of a novel pathogenic *Borrelia* species causing Lyme borreliosis with unusually high spirochaetaemia: a descriptive study', *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 16, no. 5, pp. 556–564.

Reed, SM & Toribio, R 2004, 'Lyme disease in horses', in *Equine Internal Medicine*, WB Saunders Cie, pp. 656-657.

Richard, S & Oppliger, A 2015, 'Zoonotic occupational diseases in forestry workers – Lyme borreliosis, tularemia and leptospirosis in Europe', *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, vol. 22, no. 1, pp. 43–50.

Rizzoli, A, Hauffe, H, Carpi, G, Vourc H, G, Neteler, M, Rosa, R, 2011, 'Lyme borreliosis in Europe', *Euro Surveill.*, vol. 16, 27. Consulté le 10 mai 2016 sur <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19906>

Rosef, O, Paulauskas, A & Radzijeuskaja, J 2009, 'Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* ticks in relation to the density of wild cervids', *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 51, no. 1, p. 47.

Rutjes, AWS, Reitsma, JB, Coomarasamy, A, Khan, KS, Bossuyt, PMM 2007, 'Evaluation of diagnostic tests when there is no gold standard. A review of methods', *Health Technology Assessment*, vol. 11, no.50, pp.2-17.

Schvartz, G, Epp, T, Burgess, HJ, Chilton, NB & Lohmann, KL 2015, 'Comparison between available serologic tests for detecting antibodies against *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in horses in Canada', *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.*, vol. 27, no. 4, pp. 540–546.

Sears, KP, Divers, TJ, Neff, RT, Miller Jr, WH & McDonough, SP 2012, 'A case of *Borrelia* - associated cutaneous pseudolymphoma in a horse: *Borrelia* -associated pseudolymphoma in a horse ', *Veterinary Dermatology*, vol. 23, no. 2, pp. 153–156.

Sergeant, E, Perkins, N 2015, Diagnosis and screening, in *Epidemiology for Field Veterinarians: an introduction*, CAB Int, pp. 89-116.

Stefanciková, A, Adaszek, Ł, Pet'ko, B, Winiarczyk, S & Dudinák, V 2008, 'Serological evidence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in horses and cattle from Poland and diagnostic problems of Lyme borreliosis', *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM*, vol. 15, no. 1, pp. 37–43.

Theel, ES 2016, 'The Past, Present, and (Possible) Future of Serologic Testing for Lyme Disease', *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 54, no. 5, pp. 1191–1196.

TiquesNet, consulté le 25 mai 2016, <https://tiquesnet.wiv-isp.be/reports/Results%202015_FR.pdf>

Van Boeckel, TP, Gandra, S, Ashok, A, Caudron, Q, Grenfell, BT, Levin, SA & Laxminarayan, R 2014, 'Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data', *The Lancet. Infectious Diseases*, vol. 14, no. 8, pp. 742–750.

Van Doorslaer, X, Dewulf, J, Van Langenhove, H & Demeestere, K 2014, 'Fluoroquinolone antibiotics: an emerging class of environmental micropollutants', *The Science of the Total Environment*, vol. 500-501, pp. 250–269.

van den Wijngaard, CC, Hofhuis, A, Harms, MG, Haagsma, JA, Wong, A, de Wit, GA, Havelaar, AH, Lugner, AK, Suijkerbuijk, AWM & van Pelt, W 2015, 'The burden of Lyme borreliosis expressed in disability-adjusted life years', *European Journal of Public Health*, vol. 25, no. 6, pp. 1071–1078.

Vanthomme, K, Bossuyt, N, Boffin, N & Van Casteren, V 2012, 'Incidence and management of presumption of Lyme borreliosis in Belgium: recent data from the sentinel network of general

practitioners', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, vol. 31, no. 9, pp. 2385–2390.

Veronesi, F, Laus, F, Passamonti, F, Tesei, B, Piergili Fioretti, D & Genchi, C 2012, 'Occurrence of *Borrelia lusitaniae* infection in horses', *Veterinary Microbiology*, vol. 160, no. 3-4, pp. 535–538.

Vestrheim, DF, White, RA, Aaberge, IS & Aase, A 2016, 'Geographical differences in seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* antibodies in Norway, 2011-2013', *Ticks and Tick-Borne Diseases*.

Voordouw, MJ 2015, 'Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens', *Parasitology*, vol. 142, no. 02, pp. 290–302.

Vourc'h, G, Abrial, D, Bord, S, Jacquot, M, Masségli, S, Poux, V, Pisanu, B, Bailly, X & Chapuis, J-L 2016, 'Mapping human risk of infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the agent of Lyme borreliosis, in a periurban forest in France', *Ticks and Tick-borne Diseases*, viewed 28 May 2016, <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877959X1630022X>>.

von Wintersdorff, CJH, Penders, J, van Niekerk, JM, Mills, ND, Majumder, S, van Alphen, LB, Savelkoul, PHM & Wolffs, PFG 2016, 'Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer', *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, p. 173.

Wagner, B & Erb, HN 2012, 'Dogs and horses with antibodies to outer-surface protein C as on-time sentinels for ticks infected with *Borrelia burgdorferi* in New York State in 2011', *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 107, no. 3-4, pp. 275–279.

Wagner, B, Freer, H, Rollins, A, Erb, HN, Lu, Z & Gröhn, Y 2011, 'Development of a multiplex assay for the detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in horses and its validation using Bayesian and conventional statistical methods', *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 144, no. 3-4, pp. 374–381.

Annexes

Annexe 1 : analyse rétrospective des résultats de sérologie *Borrelia burgdorferi* chez 1259 chevaux suspects de maladie de Lyme en Belgique

Annexe 2 : questionnaire utilisé pour l'étude de séroprévalence *Borrelia burgdorferi* chez les chevaux non suspects de borréliose résidant en Wallonie

Annexe 3: critères d'évaluation des bandes réactives du test WB *Borrelia burgdorferi* (OspA LINE)

Annexe 4: arbre décisionnel : évaluation de 4 stratégies de prise en charge de chevaux suspects de maladie de Lyme en Wallonie

Annexe 5 : considérations éthiques

Cette étude a reçu l'accord du Comité d'éthique Hospitalo-Facultaire Universitaire de Liège.

Le Professeur Hélène AMORY, maître d'expérience a par ailleurs reçu l'accord de l'extension temporaire d'agrément LA16 10018 Dossier Ethique 14-1744 introduite auprès du Service Bien-être Animal. Cette extension est valable jusqu'au 31 juillet 2017.